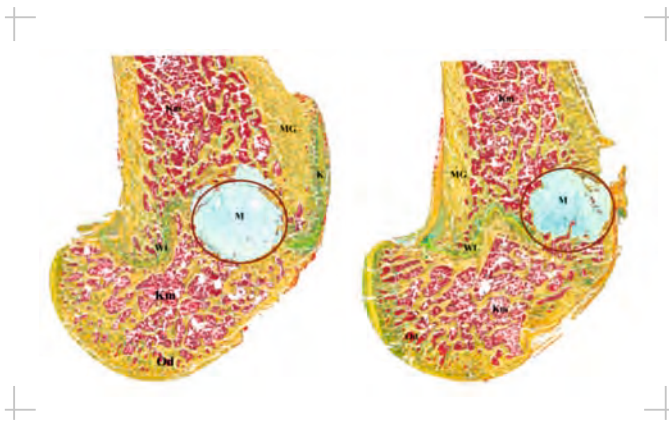


# Untersuchung der Biokompatibilität bei lokaler Anwendung von Bortezomib mit CPC als Biomaterial im metaphysären Knochen

---

**TANJA SCHEUFENS**



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Untersuchung der Biokompatibilität bei lokaler Anwendung  
von Bortezomib mit CPC als Biomaterial  
im metaphysären Knochen**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Tanja Scheufens**

aus Köln, Deutschland

Gießen, 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Schnettler

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. Melzer

Tag der Disputation: 11.11.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Multiples Myelom.....	6
1.2	Knochenaufbau.....	9
1.2.1	Osteozyten.....	11
1.2.2	Osteoblasten.....	12
1.2.3	Osteoklasten.....	15
1.3	Pathophysiologie der Osteoblastenhemmung und Osteoklastenstimulation beim Multiplen Myelom.....	19
1.3.1	Interaktion zwischen Osteoblasten und Multiplen Myelom-Zellen.....	20
1.3.2	Interaktion zwischen Osteoklasten und Multiplen Myelom-Zellen.....	21
1.4	Fragestellung.....	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1	Implantate.....	24
2.2	Versuchstiere und Tierhaltung.....	24
2.3	Tiermodell.....	25
2.3.1	Narkose.....	25
2.3.2	Operation.....	27
2.3.3	Postoperative Nachbehandlung.....	29
2.4	Probenaufarbeitung.....	29
2.4.1	Einbettung.....	29
2.4.2	Trenn-Dünnschliff-Technik.....	29
2.4.3	Histologisch-histomorphologische Untersuchungen.....	30
2.4.3.1	TRAP.....	30
2.4.3.2	Alkalische Phosphatase.....	30
2.4.3.3	Immunhistochemie.....	30
2.4.3.3.1	OPG.....	30
2.4.3.3.2	BMP2.....	31
2.4.3.3.3	RANKL.....	31
2.4.3.3.4	ASMA.....	32
2.4.3.3.5	ED1.....	32

2.4.3.4	MOVAT.....	33
2.4.3.5	Probenauswertung.....	33
2.4.3.6	Statistik.....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Histomorphometrie ALP.....	36
3.2	Histomorphometrie TRAP.....	39
3.3	Histomorphometrie ASMA.....	43
3.4	Histomorphometrie ED1.....	45
3.5	BMP-2.....	48
3.6	Histomorphometrie OPG.....	49
3.7	Histomorphometrie RANKL.....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>93</b>
	Erklärung der Dissertation.....	94
	Lebenslauf.....	95

# 1 Einleitung und Fragestellung

Interdisziplinäre Grundlagenforschung bildet die Voraussetzung zur Bewältigung aktueller und zukünftiger Herausforderungen in der Therapie systembedingter muskuloskelettaler Knochenheilungsstörungen. Die Entwicklung von Biomaterial in Kombination mit wirkstoffbeladenen Nano-Partikeln zur Biofunktionalisierung stellen hierbei Ansätze zur zielgerichteten lokalen Therapie defizitärer metabolischer Knochenheilungsstörungen dar. Gleichzeitig führt die weltweit zunehmende Lebenserwartung und die damit einhergehende signifikante Veränderung der Altersstruktur der Bevölkerung zu einer steigenden Inzidenz pathologischer Frakturen infolge maligner Erkrankungen.

Das Multiple Myelom (MM) ist die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung weltweit (de Mel et al., 2014). Trotz einer steten Verbesserung des initialen Behandlungserfolges sowie der Rezidivtherapie durch die Einführung neuer Medikamente wie beispielsweise Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib ist die Erkrankung weiterhin für einen Großteil der Patienten unheilbar (de Mel et al., 2014, Petrucci et al., 2014).

Die Zellen des Multiplen Myeloms binden an Knochenmarksstammzellen durch Adhäsion von auf seiner Oberfläche exprimierten Antigenen an Adhäsionsmoleküle, die auf der Oberfläche der Knochenmarksstammzellen exprimiert sind. Die Bindung von Multiplen Myelomzellen an die Knochenmarksstammzellen induziert die Produktion von Zytokinen, welche eine Osteoklasten stimulierende Wirkung haben (RANKL und IL-6, IL-11, Interleukin-1 $\beta$ , TNF und einen Fibroblasten Wachstumsfaktor) (Abbildung 1). Auf der anderen Seite unterdrückt es die Bildung von OPG. OPG bewirkt eine Hemmung der Osteoklastendifferenzierung. Myelomzellen produzieren weiterhin Chemokine, die die Proliferation und Differenzierung von Osteoklastenvorstufen stimulieren. Myelom-Zellen exprimieren zudem RANKL. Dieses fördert die Osteoklastendifferenzierung sowie deren Aktivierung und Proliferation (Abbildung 1). Gehemmt wird RANKL durch OPG, welches sich an RANKL bindet und so dessen Funktion unterdrückt.

Des weiteren fördern Osteoklasten, Endothelzellen und Knochenmarkstammzellen das Wachstum von Myelomzellen. Zusätzlich wird die Osteoblastenreifung und die

Funktion der Osteoblasten gehemmt, durch Wnt Signalmoleküle, wie DKK-1 und Sclerostin, die von Myelomzellen und apoptotischen Osteozyten gebildet werden. Dies hemmt die Knochenneubildung was sich in vermindertem Nachweis von bone alkaline Phosphatase (bALP) und Osteocalcin widerspiegelt (Abbildung 1).

Bortezomib wiederum stellt die Balance zwischen RANKL und OPG wieder her und hemmt die Osteoklastendifferenzierung und deren Aktivität und verhindert so den vermehrten Knochenabbau. Es hemmt die Expression von DKK-1 und steigert somit die Osteoblastendifferenzierung und die Osteoblastenaktivität, was zu vermehrter Knochenneubildung führt (Terpos und Christoulas, 2013).

Bortezomib, dessen Einfluss auf durch das multiple Myelom hervorgerufene, Osteolysen in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, ist ein selektiver Proteasomen-Inhibitor. Er nimmt durch reversible Bindung an das 26S Proteasom einen großen Einfluss auf die Degradation regulatorischer Proteine wie Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorproteine und viele weitere Proteine, wie beispielsweise RANK oder Osteoprotegerin ein (Mohty et al., 2013). Bortezomib hemmt so das Wachstum der Multiplen Myelom-Zellen und deren Adhäsion, fördert ihre Apoptose und hemmt sowohl die Bildung von Wachstumsfaktoren als auch die Angiogenese im Knochenmark (Hideshima et al., 2001; LeBlanc et al., 2002). Die Wirkung des Bortezomib entfaltet sich hierbei über verschiedene Mechanismen.

Ein entscheidendes Angriffsziel von Bortezomib ist der nuclear factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B). Es handelt sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor, der die Bildung von anti-apoptotischen Wachstumsfaktoren, sowie von verschiedenen Proteinen und Cytokinen mit proinflammatorischen und proangiogenetischen Fähigkeiten stimuliert (Ondrey et al., 1999). Der nuclear factor  $\kappa$  B ist in Zellen des multiplen Myeloms stark exprimiert und fördert damit das Größenwachstum, das Überleben und die Therapieresistenz dieser Zellen (Berenson et al., 2001; Hideshima et al., 2002). Die Wirkung von NF- $\kappa$ B kann physiologischerweise durch den inhibitor of NF- $\kappa$ B (I  $\kappa$  B) gehemmt werden. Dieses Protein wird jedoch durch Proteasomen vermehrt degradiert. Im Rahmen der proteasomalen Hemmung durch Bortezomib wird der inhibitor of NF- $\kappa$ B stabilisiert, sein Abbau verhindert und somit die das Multiple Myelom stimulierende Wirkung von nuclear factor  $\kappa$ B gehemmt (Mohty et al., 2013).

Des weiteren induziert Bortezomib die Expression von Osteocalcin und Osteopontin in mesenchymalen Stammzellen als Zeichen osteoblastischer Differenzierung (Kaiser et

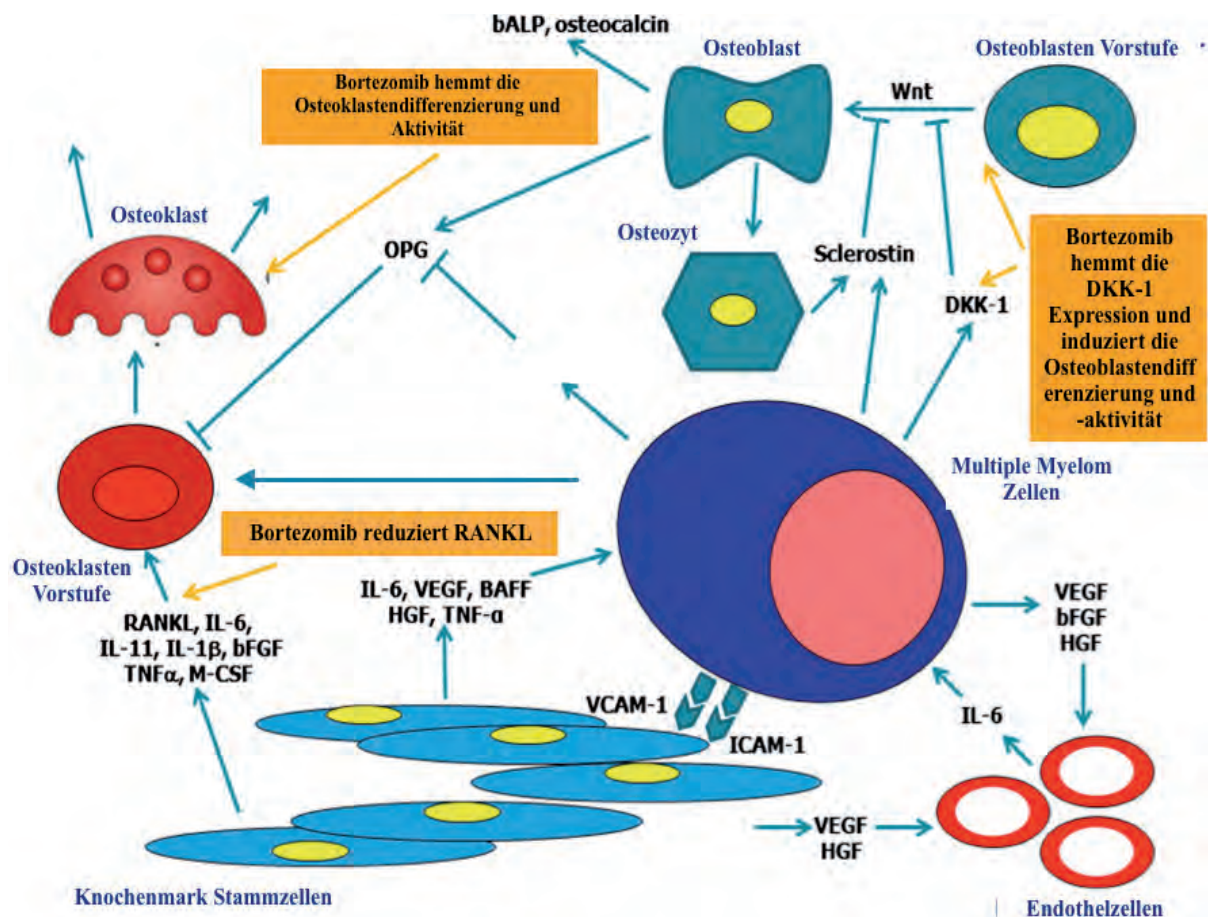


al., 2013). Beide Proteine haben eine entscheidende Funktion im Rahmen der Knochenneubildung und stellen valide Marker für diese dar. Osteocalcin inhibiert hierbei die Knochenmineralisierung durch Bindung an Calcium und Hydroxylapatit, Osteopontin unterstützt die Osteoklasten bei der initialen Bindung an die Knochenmatrix zu Beginn des Umbauprozesses (Reinholt et al., 1990). Bei der Knochenneubildung sowie der Entstehung von Osteolysen bei malignen Erkrankungen spielt des weiteren der Transkriptionsfaktor Osterix eine Rolle. Er wird von Osteoblasten exprimiert und übt einen stimulierenden Effekt auf die Knochenneubildung und die Osteoblastogenese aus (Cao et al., 2005). In Osteoblastenkulturen von Patienten mit Multiplem Myelom ist die Expression von Osterix herunterreguliert, wodurch es zu einem vermehrten Auftreten von Osteolysen kommt. Dieser Effekt ist wiederum durch Behandlung mit Bortezomib reversibel (De Matteo et al., 2010).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Proteasomen-Inhibitoren die Knochenneubildung durch vermehrte Freisetzung von bone morphogenetic protein (BMP)-2, einem Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie stimulieren können (Garrett et al., 2003). BMP-2 selbst erhöht das Level an Runx2/Cbfa-1, das die Differenzierung von Osteoblasten fördert (Giuliani et al., 2007).

Effekte von Bortezomib auf das Knochenwachstum bei systemischer Gabe konnten bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Die systemische Behandlung mit Bortezomib war assoziiert mit einem signifikanten Anstieg von Knochenvolumen. Des Weiteren konnte eine erhöhte anabole Aktivität in Knochenbiopsien von Patienten nach Gabe von Bortezomib nachgewiesen werden (Zangari et al., 2011).

Aktueller Goldstandard für die Behandlung osteolytischer Prozesse bei multiplem Myelom ist die Therapie mit Bisphosphonaten (Garrett et al., 2003; Terpos et al., 2009). Sie hemmen die osteoklastischen Effekte des Multiplen Myeloms (Berenson, 2005; Giuliani et al., 2007), stimulieren jedoch nicht die Knochenneubildung (Terpos und Chrostoulas, 2013; Zangari et al., 2012). Des weiteren besteht bei der Langzeitbehandlung der Patienten mit Bisphosphonaten ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Knochennekrosen am Kiefer (Melea et al., 2014). In einer Studie von Pavkovic und Mitarbeitern wurde anhand von 190 Patienten mit multiplem Myelom eine Inzidenz für das Auftreten von Osteonekrosen des Kiefers nach Behandlung mit Bisphosphonaten von 1% nachgewiesen (Pavkovic et al., 2010).



**Abbildung 1:** Pathophysiologie des Multiplen Myeloms und die möglichen Angriffstellen von Bortezomib. Die durch die Bindung der Zellen des multiplen Myeloms an die Knochenmarksstammzellen aktivierte Signalkaskade führt zu einer vermehrten Expression von Osteoklasten, sowie einer verminderten Expression von Osteoblasten. Bortezomib ist im Stande diese Signalkaskaden an verschiedenen Stellen zu unterbrechen und somit den Effekt des multiplen Myeloms zu inhibieren (Terpos und Christoulas, 2013).

Aktuell stehen neben den Bisphosphonaten mindestens 5 Wirkstoffklassen für die Therapie des Multiplen Myeloms zur Verfügung:

Aus der Wirkstoffgruppe der Alkylierenden Wirkstoffe das Melphalan und Cyclophosphamide, aus der Gruppe der Anthracycline das Adriamycin und liposomales Doxorubicin, aus der Gruppe der Corticosteroide das Dexamethason und Prednison, aus der Wirkstoffgruppe der immunmodulatorische Medikamente die Thalidomide und Lenalidomide und aus der Gruppe der Proteasomen Inhibitoren das Bortezomib und Carfilzomib (Mikhael et al., 2013).

Ozaki und seine Mitarbeiter konnten 2007 zeigen, dass es nach Gabe von Bortezomib in Kombination mit Dexamethason bei 2 von 14 Patienten mit einem Rezidiv des multiplen Myeloms zu einer Rückbildung der Knochenläsionen kam. Bei beiden Patienten konnten entsprechend im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Werte für alkaline Phosphatase (ALP) und Osteocalcin nachgewiesen werden (Ozaki et al., 2007).

Es konnte anhand von zwei weiteren Studien gezeigt werden, dass Responder einen deutlich vermehrten Anstieg von alkaliner Phosphatase im Vergleich zu Non-Respondern vorweisen. Im Falle eines Rückfalls normalisierte sich das alkaline Phosphatase-Level. Bei der ersten Studie (SUMMIT) wurden 77 Patienten, die an einem therapierefraktären Multiplen Myelom litten oder einen Rückfall erlitten hatten, über einen Zeitraum von achtmalig drei Wochen mit Bortezomib behandelt. Im Rahmen der zweiten Studie (APEX) wurden 422 Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt und 217 Patienten wurden über acht dreiwöchige Zyklen hinweg mit Bortezomib behandelt. Die verbliebenen 205 Patienten wurden über einen Zeitraum von vier 5-Wochen andauernden Zyklen mit Hochdosis Dexamethason behandelt. Beide Studien konnten das zuvor beschriebene Ergebnis nachweisen (Kaiser et al., 2013; Zangari et al., 2005).

Terpos und Mitarbeiter konnten ihrerseits zeigen, dass es nach Behandlung mit Bortezomib in Kombination mit Dexamethason und Zolendronsäure zu einem mehr als 10%igen Anstieg der Knochendichte der Lendenwirbel bei Respondern kam (Terpos et al., 2010).

Die Forschungsgruppe um Giuliani konnte nachweisen, dass es nach Behandlung mit Bortezomib in Kombination mit Dexamethason zu einem signifikanten Anstieg der Osteoblastendichte sowie zu einer Zunahme der Osteoidoberfläche kommt (Giuliani et al., 2007). Diese Ergebnisse lassen eine positive Prognose für die weitere Forschung im Bereich der Behandlung mit Bortezomib zu.

Bisher wurde lediglich die systemische Gabe von Bortezomib getestet und zeigte vielversprechende Ergebnisse. Daher wird in unserer Studie die lokale Anwendung von Bortezomib untersucht in Verbindung mit einem Knochenzement.

## 1.1 Multiples Myelom

Beim multiplen Myelom handelt es sich um eine unheilbare Plasmazellerkrankung, die ihren Ursprung im Knochenmark hat. Es ist durch monoklonale Plasmazellvermehrung im Knochenmark charakterisiert und ist den WHO-Kriterien zufolge, eine den B-Zell-Lymphomen zugehörige, maligne Erkrankung mit vermehrter Produktion kompletter oder inkompletter monoklonaler Immunglobuline. Diese sind dann als sogenanntes „Para-Protein“ bzw. M-Gradient mit einem Anteil von über 10% in Serum und/oder Urin nachweisbar (Meran et al., 1999).

Mit einem Anteil von etwa 15% ist das Multiple Myelom eine der häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen. Die Inzidenz liegt bei 4-6 Fällen /100.000 pro Jahr (Harousseau und Moreau, 2009). Das entspricht einer Neuerkrankungsrate von >85.000 Patienten weltweit jedes Jahr, die zu voraussichtlich etwa 62.500 Todesfällen jährlich führt („Cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide. Version 2.0. “; Jemal et al., 2005).

In Deutschland erkranken jährlich etwa 3.000 Männer und 2.700 Frauen neu an einem Multiplen Myelom. Damit ist das Multiple Myelom in Deutschland nach Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen die dritthäufigste hämatologische Neoplasie und für ca. 1 % aller Krebserkrankungen verantwortlich. Die Erkrankungshäufigkeit steigt ab dem 50. Lebensjahr deutlich an, Erkrankungen vor dem 35. Lebensjahr sind selten. Das mediane Erkrankungsalter beträgt 71 Jahre bei Männern und 73 Jahre bei Frauen.

Häufige Symptome der Erkrankung sind:

- schleichende Abnahme der Leistungsfähigkeit, allgemeine Schwäche und Anämiesymptome (ca. 40%)
- gehäuft auftretende Infektionen (10-20%)
- diffuse rheumatischen Beschwerden in Form von Knochenbeschwerden einschließlich pathologischer Frakturen und Symptome der Hyperkalzämie
- Gewichtsverlust (25%)
- schäumender Urin und Nierenfunktionsverschlechterung als Zeichen einer Bence-Jones-Proteinurie oder Albuminurie. Die vermehrt gebildeten Immunglobulin-Leichtketten werden glomerulär filtriert. Wird die Resorptionskapazität der proximalen Tubuli überschritten, kommt es zur Ausscheidung über den Urin (Kortüm und Einsele, 2011).

Eingeteilt wird die Erkrankung in 3 Stadien, nach Durie und Salmon, entsprechend der nachfolgenden Tabelle.

	Stadium I (alle Kriterien sind erfüllt)	Stadium II	Stadium III (mindestens 1 Kriterium erfüllt)
Hämoglobin	> 10 g / dl	weder Stadium I noch III	< 8,5 g / dl
Serumkalzium	normal		erhöht
Knochen	normale Struktur oder ein solitärer Herd (Röntgen)	weder Stadium I noch III	fortgeschrittene Läsionen
Myelomprotein	IgG < 50 g / l (Serum) IgA < 30 g / l (Serum) Bence Jones Protein < 4 g / 24 h (Urin)	weder Stadium I noch III	IgG > 70 g / l (Serum) IgA > 50 g / l (Serum) Bence Jones Protein > 12 g/24 h (Urin)
	Zusatzbezeichnung A		Zusatzbezeichnung B
Nierenfunktion	Kreatinin < 2mg/dl		Kreatinin > 2mg/dl

**Abbildung 2:** Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon. Bemessen wird die Stadieneinteilung nach Hämoglobinwert, Serumkalziumwert, Nachweis von IgG, IgA und Bence Jones Protein sowie der Nierenfunktion. Eingeteilt wird in Stadien I-III sowie den Zusatz A oder B (Greipp et al., 2005).

Multiple Myelom-Zellen weisen durchschnittlich eine erhöhte Anzahl an Chromosomenaberrationen auf, sowie eine Vielzahl an Veränderungen in der Genexpression, verglichen mit normalen Knochenmarksplasmazellen. Aufgrund der anomal exprimierten Faktoren durch die Zellen des Multiplen Myeloms ist das korrespondierende myelomatöse Knochenmark signifikant verändert (Seckinger et al., 2012).

Begleitend zur Myelomzellakkumulation im Knochenmark kommt es zu einer Transformation der Mikroumgebung durch Faktoren, die:

- aberrant von Myelomzellen produziert werden (z. B. Dickkopf-1 [DKK- 1])
- bereits von normalen Plasmazellen exprimiert werden und durch eine Akkumulation der Zellen in höherer Konzentration vorliegen (z. B. „vascular endothelial growth factor“ [VEGF], Annexin A2 [ANXA2], „bone morphogenic protein 6“ [BMP- 6]) oder

- solchen, die von Zellen der (sich ändernden) Mikroumgebung produziert werden.

Kennzeichen dieses Transformationsprozesses sind u. a. die Entstehung von Knochensubstanzdefekten oder eine verstärkte Angiogenese.

Sowohl die Myelom-, als auch die normalen Plasmazellen sind zum Überleben auf eine Interaktion mit Stroma- und Endothelzellen, sowie Osteoklasten und extrazellulärer Matrix angewiesen. Die Plasma- und Myelomzellen werden zum einen von durch Osteoklasten produzierte Wachstumsfaktoren stimuliert, ebenso wie durch Wachstumsfaktoren, die bei der Degradation der Knochenmatrix freigesetzt werden. Zusätzlich besteht z. B. eine direkte integrinvermittelte Interaktion mit Fibronektin der ossären Matrix. Osteoklasten stimulieren auch durch direkten Kontakt mit Myelomzellen deren Proliferation und Überleben. Im Gegenzug beeinflussen die Multiplen Myelom-Zellen ihrerseits die Knochenmarkmikroumgebung durch die Produktion von Stoffen, die die Aktivität der Osteoblasten senkt und die der Osteoklasten steigert (Seckinger und Hose, 2014).

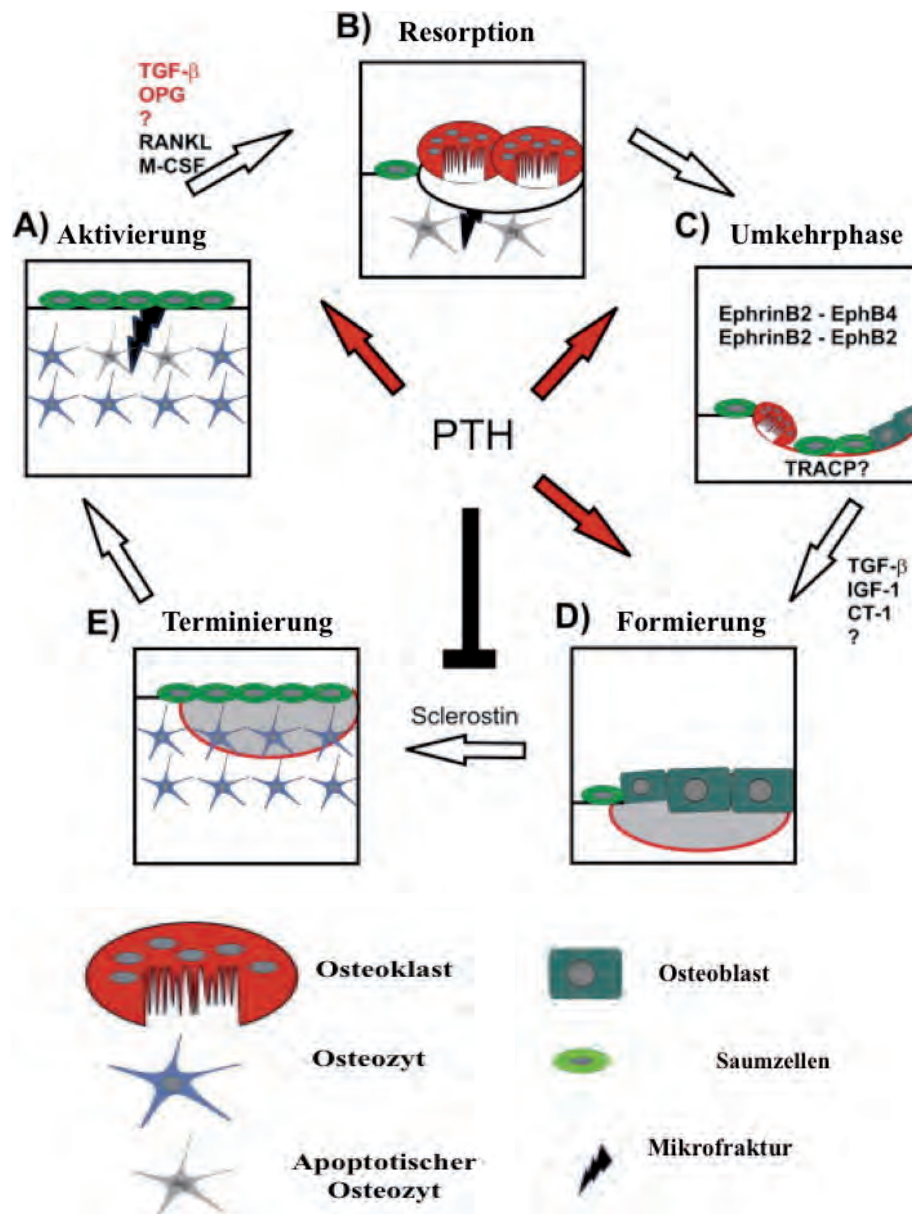
Über 80% der Patienten, die an einem Multiplen Myelom erkranken, entwickeln osteolytische Knochenläsionen im Achsenskelett, dem proximalen Anteil der langen Röhrenknochen, den Rippen oder dem Schädel, die oft mit Hyperkalzämie sowie ausgeprägten Knochenschmerzen, Wirbelkörperimpressionsfrakturen und pathologischen Frakturen assoziiert sind. In 20% zeigt sich eine diffuse Osteopenie, insbesondere der Wirbelsäule mit Impressionsfrakturen und gelegentlicher Kompression des Rückenmarkes (Battegay, 2012). Der Anteil der Patienten mit Multiplem Myelom, die eine pathologische Fraktur erleiden, liegt bei etwa 40-50%. Dies hat zur Folge, dass die Überlebensrate im Vergleich zu Patienten ohne pathologische Frakturen um 20% sinkt (Saad et al., 2007; Sonmez et al., 2008). 78% der Frakturen treten am Achsenskelett auf. Bei den auftretenden Frakturen handelt es sich in zwei Drittel der Fälle um pathologische Frakturen, hervorgerufen durch das Myelom selbst (Melton et al., 1999). Die osteolytischen Knochenläsionen entstehen durch eine erhöhte Stimulation der osteoklastären Knochenresorption ohne eine konsekutiv gesteigerte osteoblastäre Knochenneubildung. Dieses durch die entarteten Plasmazellen verursachte Ungleichgewicht führt dann zu den beschriebenen vermehrten pathologischen Frakturen bei Patienten mit multiplem Myelom (Giuliani et al., 2006).

Diese Situation konnte nur bei Patienten mit knöchernen Läsionen beobachtet werden. Patienten, die an Multiplem Myelom litten, jedoch keine Knochenläsionen hatten, zeigten lediglich eine vermehrte Knochenresorption, bei normaler oder sogar gesteigerter Knochenneubildung (Bataille et al., 1989; Bataille et al., 1990).

## 1.2 Knochenaufbau

Knochen ist eine durchlässige mineralisierte Struktur, die sich aus Zellen, Blutgefäßen und Kristallen aus Calciumverbindungen (Hydroxylapatit) zusammensetzt (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Die Knochensubstanz besteht aus Osteozyten (Knochenzellen), die in eine Knochenmatrix eingebettet sind. Die unverkalkte Knochenmatrix wird Osteoid genannt und von Osteoblasten gebildet. Sie beinhaltet etwa 15% Wasseranteil. Nach Abzug des Wasseranteils besteht sie aus verbleibenden 30% organischer Substanz und 70% anorganischer Substanz. Die organische Komponente wiederum besteht zu 90% aus Fibrillen des Kollagen Typ I und sorgt für die Elastizität und Zugfestigkeit des Knochens, wohingegen das daran angelagerte kristalline Kalziumhydroxylapatit, das wiederum über 95% der anorganischen Substanz ausmacht, für die hohe Druckfestigkeit des Knochens verantwortlich ist. Der Knochen befindet sich in stetigen Umbauprozessen, die vorwiegend von Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Saumzellen reguliert werden. Die Osteoblasten die den Knochenaufbau regulieren, sowie die Osteoklasten, die der Resorption von Knochen dienen arbeiten für gewöhnlich in einem Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht kann jedoch von einer Vielzahl von Faktoren zu einer Dysregulation gebracht werden. Der menschliche Knochen besteht aus kortikalen und spongiösen Anteilen. Im Bereich der langen Röhrenknochen überwiegt der Anteil an Kortikalis, wohingegen im Bereich des Achsenskelettes sowie des Schenkelhalses der spongiöse Anteil überwiegt. Der spongiöse Knochen setzt sich aus einem trabekulären Netzwerk zusammen und ist überwiegend für den systemischen Knochenstoffwechsel verantwortlich. Nur 25% des Knochenstoffwechsels finden in der Kortikalis statt, die restlichen 75% im trabekulären Knochenanteil (Neumann und Schett, 2007). Der Knochen befindet sich in stetigen Umbauprozessen, die vorwiegend von Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Saumzellen reguliert werden, um eine korrekte strukturelle Zusammensetzung und somit die Knochenfestigkeit zu gewährleisten. Die Osteoblasten, die den Knochenaufbau regulieren, sowie die Osteoklasten, die der Resorption von Knochen dienen, arbeiten für gewöhnlich in einem Gleichgewicht. Diese Umstrukturierung erfolgt nach den Prinzip des „Activation-Resorption-Formation (AFR) cycle“ (siehe Abbildung 3) (Henriksen et al., 2009). Den Anstoß für lokales Knochenremodelling können beispielsweise mechanische Faktoren setzen, die über Osteozyten, als Sensor des Traumas, die Invasion von Osteoklasten und die Resorption von Knochen anstoßen und somit den Aktivierungs-Resorptions-Formations-Kreis in Gang setzen (Aktivierung) (Abb. 3A) (Neumann und Schett, 2007). Dies geschieht, indem Osteozyten als

Reaktion auf den mechanischen Stress in Apoptose eintreten und RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand) sowie M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) ausschütten, was wiederum in der Resorptionsphase zu einer vermehrten Osteoklastogenese und somit zu einer Resorption von Knochenmatrix führt (Abb. 3B).



**Abbildung 3 a-e:** Schematische Darstellung von lokalen Kommunikationsmechanismen zur Knochenneubildung (Henriksen et al., 2009).



Die Osteoklasten bilden Resorptionslakunen aus und schütten während dieses Prozesses bereits Stoffe aus, die die nächste Phase des Kreislaufes initiieren, die sogenannte Rückbildungsphase (Abb. 3C). In dieser Phase erfolgt die „Reinigung“ der Resorptionsfläche durch Saumzellen. Dieser Prozess scheint durch direkte Zellinteraktion und Aktivierung der Ephrin-Eph-Signalkaskade stimuliert zu werden. In der sich anschließenden Formierungsphase (Abb. 3D) werden die Saumzellen in Osteoblasten umgewandelt oder durch sie ersetzt. Dieser Prozess wird durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-I, TGF- $\beta$  und Cardiotrophin-1 (CT-1) durch die Osteoklasten reguliert. Die Vorläuferzellen der Osteoblasten wandern in die von Osteoklasten gebildeten Lakunen ein und differenzieren sich dort zu metabolisch aktiven Osteoblasten aus, die Osteoid bilden und den Defekt auffüllen. Die Mineralisation des neuen Osteoids erfolgt abschließend durch das Einlagern von Hydroxyapatitkristallen (Neumann und Schett, 2007). Die Osteoblasten füllen nun den Knochendefekt erneut auf. Nach Abschluss der Knochenneubildung wird durch die neu gebildeten Osteozyten das anti-anabolische Glykoprotein Sclerostin abgesondert. Dieses beendet den Kreislauf und überführt den Prozess in einen Ruhezustand, in dem die Saumzellen erneut die Knochenoberfläche besetzen (Abb. 3E) (Henriksen et al., 2009).

### **1.2.1 Osteozyten**

Bei Osteozyten handelt es sich um die im Knochen vorwiegend auftretenden Zellen. Sie repräsentieren 90-95% aller Zellen des erwachsenen Skeletts (Rocheffort et al., 2010). Sie sind die letzte Differenzierungsstufe der Osteoblasten und sind in der Lage über Jahre in der Knochenmatrix zu überleben, wohingegen Osteoklasten lediglich eine Überlebensdauer von wenigen Tagen bis Wochen haben (Rocheffort, 2014).

Reife Osteozyten weisen eine einzigartige Zellstruktur auf. Sie haben eine sternförmige Morphologie mit einem dendritischen Netzwerk, auch lakunär-kanalikuläres System genannt. Über dieses System stehen sie in Verbindung mit anderen Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und dem Gefäßsystem. Die Zwischenräume dieses Systems werden mit Knochenflüssigkeit gefüllt. Das Netzwerk ist durch die engen interzellulären Verbindungen in der Lage auf Veränderungen der mechanischen Stimuli im Knochen zu reagieren (Knothe Tate et al., 1998).

Osteozyten exprimieren neben den Knochenformationsmarkern wie beispielsweise das Osteocalcin, alkalischer Phosphatase und Osteopontin das Sonst-Gen. Das Produkt, das von

dem Sost-Gen erzeugt wird ist Sclerostin. Es antagonisiert verschiedene Mitglieder der BMP (bone morphogenetic protein)-Familie und reguliert somit die Formation und Aktivität der Osteoblasten (Abbildung 3D, E) (Bellido, 2014; Neve et al., 2012).

Osteozyten produzieren außerdem RANKL (receptor activator of nuclear factor-  $\kappa$ B ligand) und Osteoprotegerin (OPG), sowie M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). RANKL und M-CSF sind Schlüsselmoleküle für die Osteoklastenformierung und -aktivierung und somit für die Knochenresorption (Abb. 3A, B) (Hamdy, 2007).

Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass RANKL und OPG primär von Osteoblasten exprimiert werden. Es konnte jedoch mittlerweile nachgewiesen werden, dass die Osteozyten die wichtigste Quelle für RANKL und OPG darstellen. Nakashima und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass Mäuse mit osteozytenspezifischem RANKL-Knockout an einer schweren Osteopetrose leiden (Nakashima et al., 2011).

Die Knochenresorption wird durch die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK, welcher auf Osteoklasten exprimiert wird induziert. RANKL wird antagonisiert von OPG, das ebenfalls an RANK bindet und somit die Knochenresorption hemmt (Sapir-Koren und Livshits, 2014).

### **1.2.2 Osteoblasten**

Osteoblasten entwickeln sich aus periostalen oder endostalen pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Sondag et al., 2013). Verschiedene miteinander interagierende Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Differenzierung in Osteoblasten, beispielsweise der Transkriptionsfaktor Runx2, auch Cbfa1 genannt (Otto et al., 1997). Dieser wird vermehrt in unreifen Osteoblasten exprimiert und in reifen Osteoblasten herunterreguliert. Runx2 hemmt Osteoblastenreifung und die Formierung von reifem Knochen (Komori, 2010). Dieser Faktor stimuliert somit primär die frühe Osteoblastendifferenzierung. Ein Transkriptionsfaktor, der im Gegensatz dazu für die späte Osteoblasten-Differenzierung essenziell ist, ist das Osterix (Nakashima et al., 2002).

Osterix steht unter transkriptioneller Kontrolle von Runx2 und induziert seinerseits die Expression von Osteocalcin, Osteopontin und BMPs (Bone morphogenetic proteins) (Gao et al., 2004; Tsai et al., 2011). Die transkriptionelle Aktivität von Osterix wird unter anderem über den Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg stimuliert. Bei Wnts handelt es sich um Familie von Glykoproteinen, die 19 Proteine umfasst.

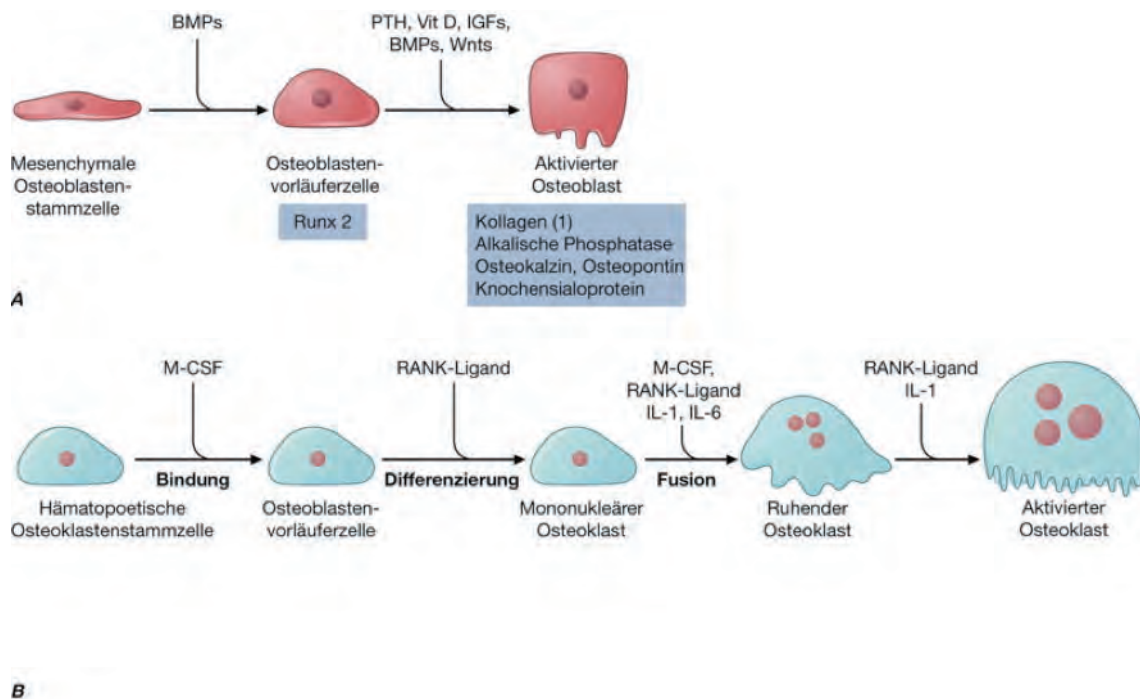
Die vermehrte Expression von Osterix führt wiederum durch die damit verbundene vermehrte Expression von BMP's zu einer vermehrten Umwandlung von MSCs in Osteoblasten (Abbildung 4A).

Eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst die Entwicklung, Reifung und Differenzierung von Osteoblasten, wie beispielsweise die Wachstumsfaktoren wie FGF und IGF, Endothelin-1, Hormone wie Parathormon, Prostaglandin-Agonisten und BMPs (Abbildung 4A) (Qin et al., 2003). Es existieren mehr als 30 verschiedene Isoformen von BMPs, die alle der Superfamilie der TGF- $\beta$  angehören (transforming growth factor). Diese reguliert die Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Chemotaxis, Angiogenese und ist beteiligt an der Entwicklung der meisten Gewebe und Organe in Wirbeltieren (Hruska et al., 2005; Wang et al., 2013). TGF- $\beta$  wird seinerseits von Osteoklasten freigesetzt im Rahmen der Resorptionstätigkeit. BMPs regulieren neben der Osteoblastenproliferation auch den bereits beschriebenen Transkriptionsfaktor Runx2/Cbfa1 (Bae et al, 2001).

Auch wenn das genaue Regulationsprinzip der Runx2/Cbfa1 Expression nicht vollständig geklärt ist, so ist doch sicher, dass es sich bei den BMPs um einen entscheidenden Faktor der Hochregulierung des Transkriptionsfaktors handelt und somit um einen Stimulator der Knochenformation und Osteoblastendifferenzierung (Takazawa et al., 2000; Wu und Lu, 2008).

Der vollständig differenzierte Osteoblast zeichnet sich durch die Coexpression von ALP und Typ I Kollagen aus. Beide Stoffe sind für die Synthese von Knochenmatrix und für die nachfolgende Mineralisierung entscheidend (Abb. 4A) (Chen et al., 2013; Murshed et al., 2005).

Die Expression der ALP wird durch BMP-2 indirekt reguliert. BMP-2 aktiviert zu dem Zwecke den Wnt Signalweg, der seinerseits die Expression des ALP hochreguliert (Rawadi et al., 2003). Des Weiteren produzieren reife Osteoblasten Osteoprotegerin (OPG), Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und RANKL sowie den Parathormonrezeptor PTHR1. Diese Stoffe regulieren die Mineralisation der Knochenmatrix (Abbildung 4A) (Eriksen, 2010).



**Abbildung 4A-B:** Entwicklung der Osteoblasten (A) und Osteoklasten (B). A) BMPs haben einen stimulierenden Einfluss auf die Umwandlung von Stammzellen in Osteoblastenvorläuferzellen. Diese wiederum produzieren Runx 2. Die Umwandlung der Vorläuferzelle in einen aktivierten Osteoblasten wird durch Parathormon, IGFs, BMPs und Wnts sowie Vitamin D stimuliert. Der aktivierte Osteoblast sezerniert zur Mineralisation der Knochenmatrix Stoffe wie Kollagen 1, alkalische Phosphatase, Osteokalzin, Osteopontin und Knochensialoprotein. B) Die Entwicklung der Osteoklasten wird von RANK-Ligand maßgeblich stimuliert. Ebenfalls stimulierend auf die Differenzierung eines mononukleären Osteoklasten in einen ruhenden Osteoklasten wirken IL-1 und IL-6 sowie der Macrophage Colony-Stimulation Factor (M-CSF). RANKL und IL-6 stimulieren die Umwandlung des ruhenden in einen aktivierten Osteoklasten (Harrison Innere Medizin 18. Auflage, Berlin, 2012).

Reife Osteoblasten haben nach Ablauf ihrer Überlebensdauer drei mögliche verschiedene Schicksale. Sie können sich in Osteozyten oder Saumzellen umwandeln oder apoptotisch werden (Bellido, 2014).

### 1.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten gehören zum mononukleär-phagozytären System. Es handelt sich bei ihnen um mehrkernige Zellen, die durch die mehrfache Fusion von mononukleären Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) des Knochenmarkes (Abbildung 4B) und gehören der Zellreihe der Monozyten/Makrophagen an. Osteoklasten sind für die Knochenresorption zuständig. Der erste Schritt der Knochenresorption besteht in einem festen Anheften der Osteoklasten an die Knochenoberfläche. Durch massenhafte Fusion von sauren Vesikeln mit der Zellmembran im Bereich der Anheftungsstelle faltet sich diese zum so genannten Bürstensaum auf. Diese charakteristische Struktur besitzt eine Schlüsselfunktion für die Resorption. Die Freisetzung der Calciumionen aus dem Hydroxylapatit des Knochens erfordert die Sekretion großer Mengen Säure. Das gleiche gilt für den Abbau von Matrixproteinen, vor allem Kollagen, durch die von den sauren Vesikeln ausgeschütteten sauren Proteasen (vor allem Cathepsin K), mit deren Hilfe die Osteoklasten Resorptionslakunen in den Knochen graben (Kornak et al., 2003).

Die Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten ist, obwohl sie als Gegenspieler fungieren, eng miteinander verknüpft.

Die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten wird durch Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert.

Die entscheidenden Regulatoren der Osteoklasten sind:

- RANK (receptor activation of NF- $\kappa$ B) und sein Ligand RANKL:

Über das RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System wird von den Osteoblasten das Heranreifen und die Aktivität der Osteoklasten gesteuert (Abbildung 5). Bei sinkendem Calciumspiegel, wird so beispielsweise von der Nebenschilddrüse vermehrt Parathormon (PTH) ausgeschüttet. Die Osteoklasten selbst haben keine Rezeptoren für das PTH. So wirkt das PTH zunächst auf die Osteoblasten, die daraufhin die Expression von RANKL steigern. Die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK stimuliert die Umwandlung von Monozyten in aktivierte Osteoklasten (Abbildung 4B), was zu einer vermehrten Knochenresorption und als Folge davon zu einem erneuten Anstieg des

Calciums führt (Barillé-Nion und Bataille, 2003; Kornak et al., 2003).

- Osteoprotegerin (OPG):

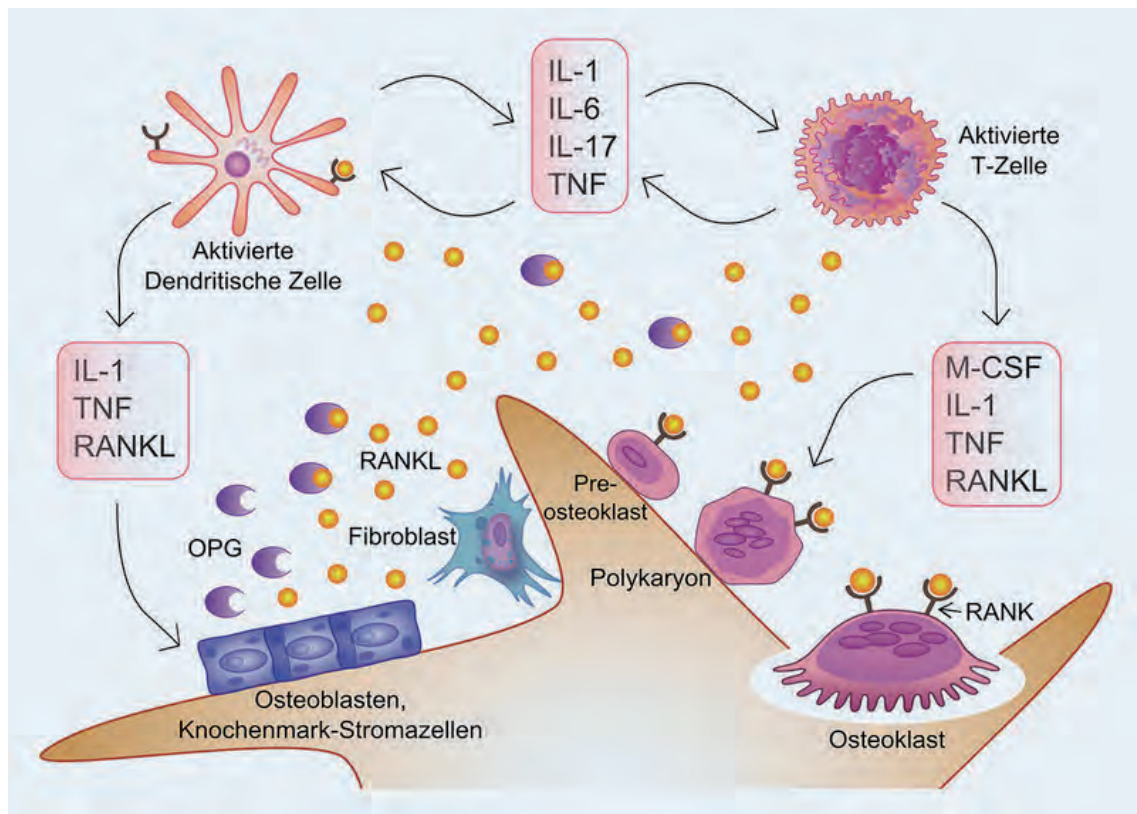
OPG wird unter Einfluss von Estradiol von Osteoblasten gebildet und wirkt als „Lock“rezeptor, indem es durch das Binden an RANKL dessen Aktivität und somit die Osteoklastenproduktion hemmt (Abbildung 6) (Boyle, 2003).

- Interleukin-1 und TNF- $\alpha$ :

IL-1 und TNF- $\alpha$ : werden ebenfalls als osteoresorptive Faktoren angesehen und stimulieren die Sekretion von M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) durch die Osteoblasten. M-CSF steigert durch die Bindung an seinen Rezeptor c-Fms auf den Vorläuferzellen der Osteoklasten die Anzahl der Vorläuferzellen. Diese können durch Stimulierung mittels RANKL in reife Osteoklasten umgewandelt werden und M-CSF stimuliert somit den Knochenabbau (Abbildung 4B) (Jules und Feng, 2014; Dischereit und Lange, 2014; Nakamura et al., 2012).

Proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ ) sind in der Lage die Bildung von RANKL zu induzieren und zeigen dabei synergistische Effekte (Abbildung 5):

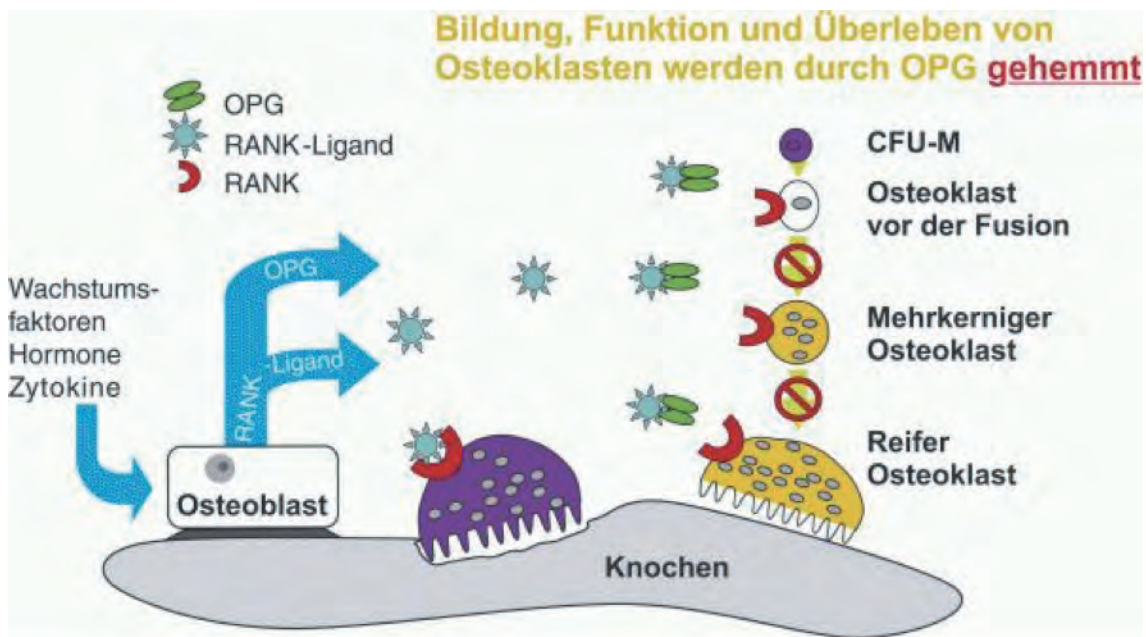
- TNF induziert die Exprimierung von Wnt-Antagonisten wie Dickköpf (DKK) -1 und hemmt so die Knochenformation.
- IL-1 limitiert die von TNF- $\alpha$  induzierte Knochenresorption, durch eine verminderte RANK-Expression (Neumann et al., 2007). Auch unabhängig von RANKL sind IL-1 positive induktive Eigenschaften in der Osteoklastendifferenzierung zuzuordnen (Moon et al., 2013).
- IL-6 stellt ebenfalls einen entscheidenden Faktor bei der Osteoklastogenese dar. Es stimuliert die Expression von RANKL und ist ein Bindeglied zwischen der Plasmazellreifung und der Osteoklastenbildung (Liu et al., 2006; Wong et al., 2006).
- IL-17 ist ein zentraler Trigger der Osteoklastenbildung durch Induktion der TNF- und IL-1-Expression (Kotake et al., 1999) (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf den Knochenmetabolismus. Entzündungszellen setzen eine Reihe proinflammatorischer Faktoren frei, die zum einen eine Aktivierung weiterer Immunzellen, wie T-Zellen oder dendritische Zellen bewirken und zum anderen die Osteoklastogenese stimulieren. Proentzündliche Faktoren induzieren zudem die Bildung von RANKL durch Osteoblasten und Fibroblasten. RANKL wird entweder durch OPG inaktiviert oder bindet an seinen Rezeptor RANK auf Präosteoklasten, reifen Osteoklasten und dendritischen Zellen, was zu einer Proliferation und erhöhten Überlebensrate der Osteoklasten führt (Dischereit und Lange, 2014).

Neben den bereits genannten Faktoren, hat auch das Wnt/ $\beta$ -Catenin einen Effekt auf die Osteoklastogenese stimulierenden oder inhibierenden Faktoren und somit auf die Knochenresorption. So stimuliert der Wnt/ $\beta$ -Catenin Komplex die Produktion und Sekretion von Osteoprotegerin (OPG). Dieses fungiert, wie bereits erläutert, als natürlicher Antagonist des RANKL, das seinerseits die Osteoklastogenese stimuliert (Abbildung 6) (Glass et al., 2005; Manolagas, 2014).





**Abbildung 6:** Der Körper bildet das Schutzprotein Osteoprotegerin (OPG), das den RANK-Liganden bindet. Dadurch blockiert es RANK-Ligand für die Bindung an RANKL auf den Osteoklasten und hemmt somit die Osteoklastogenese (Preisinger, 2007).

Osteoklasten selbst setzen im Rahmen der Knochenresorption Tartrat resistente alkalische Phosphatase (TRAP) frei.

Von Minkin und seinen Mitarbeitern wurde bereits im Jahre 1982 festgestellt, dass sich TRAP als guter Marker für die Osteoklastenaktivität eignet. Die Aktivität von TRAP ist ebenfalls pathologisch erhöht im Falle von Erkrankungen, die eine erhöhte Knochenresorption zur Folge haben, wie beispielsweise Osteoporose, Hyperparathyreodismus und einige maligne Erkrankungen (Capeller et al., 2003; Chamberlain et al., 1995), wie auch das in dieser Arbeit untersuchte Multiple Myelom. Es wurde mittlerweile herausgefunden, dass die Funktion des TRAP die eines Osteoklastenmarkers bei Weitem übersteigt.

Am Mausmodell konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass im Falle eines Fehlens von TRAP die langen Röhrenknochen der Extremitäten, sowie das Achsenskelett dicker, kürzer und die Kortikalis verdickt sind. Die Wachstumsfugen waren weiter und desorganisiert, mit einer verzögerten Mineralisation von Knorpel. Die Chondrozyten erschienen zudem unorganisiert, hypertroph und hyperplastisch. Insgesamt zeigten sich Zeichen einer milden Osteopetrose. Weiterhin beeinflusst TRAP auch die



Osteoblastenregulierung und somit den Knochenaufbau. Die Wachstumsrate von Zellen ohne TRAP ist beispielsweise signifikant reduziert und die Zellen selbst erscheinen in der Zellmorphologie verändert. Die Mineralisation der Osteoblasten erfolgte zudem früher bei einem entsprechenden Anstieg an TRAP (Hayman, 2008). Auch dies ist erneut ein eindrückliches Beispiel für die enge Vernetzung der Expression von Osteoklasten und Osteoblasten.

Das bereits im zuvor in Hinblick auf die Osteoblasten beschriebene BMP-2 übt nicht ausschließlich, einen positiven Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung aus, sondern reguliert auch die Differenzierung von Osteoklasten. Osteoklasten selbst exprimieren BMP-Rezeptoren und deren Liganden BMP2 und BMP7. Es konnte festgestellt werden, dass in Anwesenheit von BMP2 eine geringere Menge an RANKL notwendig ist für die Differenzierung von Knochenmarks-Makrophagen (BMMs) in reife Osteoklasten. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass unter Einfluss von BMP2 die Osteoklasten in Ihrer Ausprägung größer erscheinen, als unter dem Einfluss von RANKL alleine (Broege et al., 2013). Es wird sowohl die Überlebensdauer als auch die Aktivität der Osteoklasten, durch den Einfluss von BMP auf RANKL bei der Knochenresorption gesteigert (Pham et al., 2011).

### **1.3 Pathophysiologie der Osteoblastenhemmung und Osteoklastenstimulation bei Multiplem Myelom**

Das Zusammenspiel von Knochenneubildung und –resorption wird durch die Zellen des Multiplen Myeloms auf verschiedenste Weisen aus dem Gleichgewicht gebracht. In den an Multiplen Myelom-Zellen angrenzenden Gebieten steigt die Aktivität der Osteoklasten, was zu einer erhöhten Knochenresorption führt. Die Osteoblastenaktivität wiederum sinkt, was zu einer verminderten Knochenneubildung führt (Oranger et al., 2013). Die Mechanismen, die dies bewirken, werden im Folgenden im Detail erläutert.

### **1.3.1 Interaktion zwischen Osteoblasten und Multiplem Myelom-Zellen:**

Hauptsächlich werden Osteolysen beim Multiplen Myelom durch eine vermehrte Stimulation der Osteoklastenbildung und –aktivität in der Umgebung des Multiplen Myeloms hervorgerufen. Histomorphologische Studien konnten zudem nachweisen, dass Patienten mit Multiplem Myelom und Osteolysen, eine verminderte Anzahl an Osteoblasten und eine herabgesetzte Knochenneubildungsrate aufweisen. Die Multiplen Myelom-Zellen hemmen somit die in der Umgebung befindlichen Osteoblasten an der Proliferation und erhöhen die Apoptoserate. Die Stimulation der Osteoblastogenese erfolgt in gesunden Zellen durch Aktivierung von Runx2/Cbfa1 (Runt-related transcription factor 2/Core binding factor subunit alpha-1). Durch die Zellen des Multiplen Myeloms wird dieser Vorgang inhibiert. Dies erfolgt entweder über direkte Zell-Zell-Interaktion oder durch die Sekretion von IL-7 (Giuliani et al., 2006). IL-7 senkt die Aktivität von Runx2/Cbfa1 und hemmt weiterhin den frühen Osteoblasten Vorläufer CFU-Fs (colony-forming unit-fibroblast) ebenso, wie den weiter differenzierten Vorläufer CFU-Obs (colony-forming unit-osteoblast) (Weitzmann et al., 2002). Zudem wird über die Blockierung von Runx2/Cbfa1 zusätzlich die Sekretion von Osteoprotegerin (OPG) inhibiert, einem Inhibitor der Osteoklastogenese (Thirunavukkarasu et al., 2000).

In 70% der Patienten mit Multiplem Myelom konnte ein erhöhtes Level des Interleukins 3 (IL-3) nachgewiesen werden. Dieses hemmt die Umwandlung von Präosteoblasten zu Osteoblasten (Ehrlich et al., 2005; Lee et al., 2004).

Multiple Myelom-Zellen hemmen jedoch nicht nur die Differenzierung von Osteoblasten, sie steigern ebenso den Zelltod der Osteoblasten über rekombinanten TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Tinhofer et al., 2006). Im Gegenzug schützen die Osteoblasten die Multiplen Myelom-Zellen vor TRAIL-bedingter Apoptose, durch die Freisetzung von OPG, einem Rezeptor für TRAIL und RANKL (Shipman und Croucher, 2003). Durch die Bindung von RANKL hemmt OPG NF- $\kappa$ B, der einen zentralen und schnell agierenden Transkriptionsfaktor für Gene des Immunsystems darstellt, sowie einen Schlüsselregulator für Entzündungsreaktionen, Immunität und Zellüberleben bzw. Differenzierung (Krakauer, 2008). Umgekehrt unterstützen die Osteoblasten selbst das Wachstum und das Überleben der Multiplen Myelomzellen (Silvestris et al., 2003) durch die Expressierung von IL-6, was das Wachstum der Multiplen Myelom-Zellen stimuliert (Barillé et al., 1995).

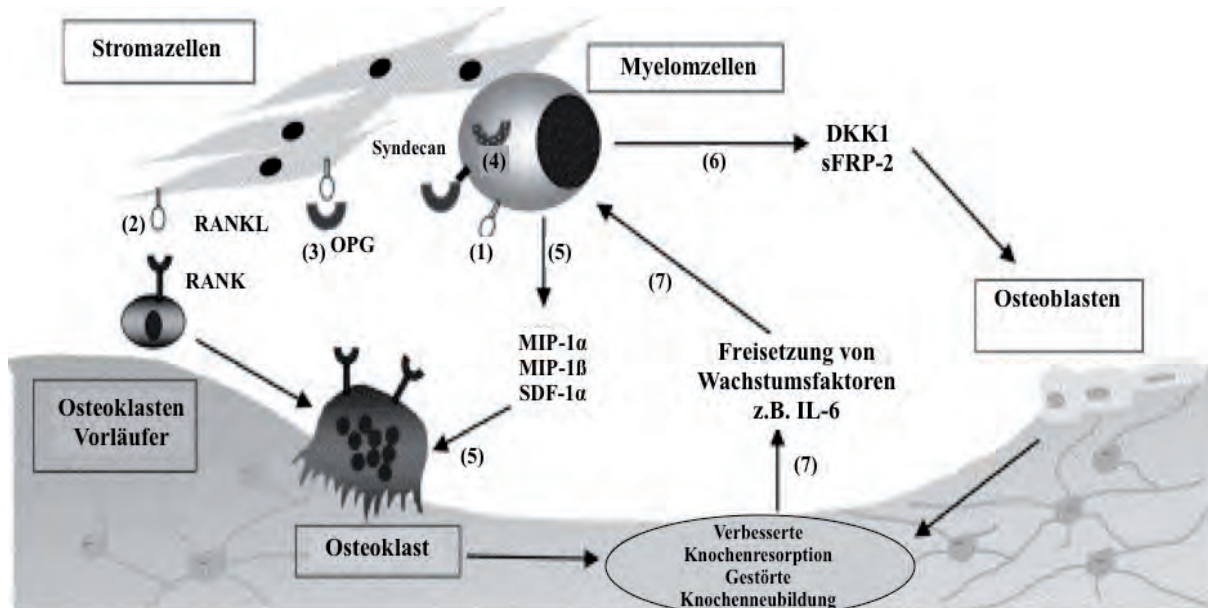
### 1.3.2 Interaktion zwischen Osteoklasten und Multiplem Myelom-Zellen:

Die Zellen des Multiplen Myeloms üben nicht nur einen Einfluss auf die Osteoblasten und deren Differenzierung aus, sondern stimulieren zudem die Osteoklasten Aktivität.

Multiple Myelom-Zellen produzieren verschiedene Stoffe, die in der Osteoklastenaktivierung eine Rolle spielen. Zu diesen gehört das Interleukin 3 (IL-3), welches die Umwandlung von Osteoklastenvorstufen in reife Osteoklasten stimuliert (Oranger et al., 2013).

Das Chemokin MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) aus der RANTES-Zytokin-Familie (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) wird ebenfalls vermehrt von Multiplen Myelomzellen produziert (Heider et al., 2006). Es korreliert mit dem Auftreten von osteolytischen Läsionen und der Überlebensrate der Patienten und stimuliert die Differenzierung von Osteoklasten aus Monozyten und dendritischen Zellen durch Transdifferenzierung (Rivollier et al., 2004; Uneda et al., 2003) und Expression von RANKL (Barillé-Nion und Bataille, 2003). Die Osteoklastenaktivität wird desweiteren durch das Chemokin MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ) stimuliert (Roodman, 1997) (Siehe Abbildung 7).

Multiple Myelom-Zellen induzieren indirekt über die Stimulation von Knochenmarkstromazellen die Expression von Aktivin A. Das Aktivin A wirkt sowohl inhibierend auf die Osteoblasten, als auch stimulierend auf die Osteoklasten (Vallet et al., 2010). Das RANKL/OPG Verhältnis ist bei Patienten mit Multiplem Myelom im Serum signifikant erhöht (siehe Abbildung 7). Dies ist ein Indikator für einen erhöhten Metabolismus der Osteoklasten und den Grad der Knochendestruktion. Das Verhältnis von RANKL zu OPG kann als Referenz für die Diagnose des Multiplen Myeloms genutzt werden (Xu et al., 2010) und korreliert eng mit dem Auftreten von TRAP, einem Marker für die Osteoklastogenese. Das entsprechend durch das Multiple Myelom verschobene Verhältnis von RANKL zu OPG zugunsten des RANKL setzt einen Circulus vitiosus zwischen Osteoklasten und Multiplen Myelom-Zellen in Gang. Die vermehrte Knochenresorption setzt Zytokine und Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Knochenmatrix frei (TGF- $\beta$ , IL-6 etc.) und stimuliert somit wiederum die Myelomproliferation.



**Abbildung 7:** Pathophysiologie des Multiplen Myeloms.

Die Zellen des Multiplen Myeloms produzieren RANKL (1) und führen zu einer Überexprimierung von RANKL in Stromazellen (2). OPG ist ein Antagonist von RANKL (3). Multiple Myelomzellen Zellen hemmen die OPG Exprimierung durch Stromazellen und binden freies OPG (4). Das veränderte RANKL/OPG Verhältnis stimuliert die Osteoklastenaktivität und Reifung. Zusätzlich exprimieren Multiple Myelom-Zellen MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und SDF-1 $\alpha$ , die die Osteoklastenaktivität steigern und Osteoklastenvorstufen rekrutieren (5). Desweiteren sezernieren die Multiplen Myelom-Zellen verschiedene Proteine, welche die Osteoblasten-Differenzierung und Funktion hemmen (6). Die resultierende vermehrte Knochenresorption setzt Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die wiederum die Proliferation und die Überlebensdauer der MM Zellen steigern (7) (Heider et al. 2006).

## 1.4 Fragestellung

Die Effekte von Bortezomib wurden bislang lediglich im Rahmen der intravenösen Anwendung von Bortezomib beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es festzustellen, ob die beschriebenen Effekte des Bortezomib auf die Multiplen Myelom-Zellen auch bei lokaler Applikation von Bortezomib auf spongiösem Knochen, bzw. an durch das Multiple Myelom hervorgerufenen Osteolysen erzielt werden können.

Zu diesem Zweck verwendeten wir einen neuen Drei-Phasenverbundwerkstoff aus Kollagen,

Silikat und Calciumphosphat. Dieser wurde von unserem Kooperationspartner, der Universität Dresden, entwickelt und kombiniert die integrationsstimulierenden Effekte des Kollagens bzw. des Silikats in der Extrazellulärmatrix mit dem osteokonduktiven Effekt des Calciumphosphats (Heinemann et al., 2007).

Dem Drei-Phasenverbundwerkstoff wurde, in Wasser gelöstes, Bortezomib in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Dieses verteilt sich homogen in dem Probenvolumen und erlaubt somit eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung.

Im Rahmen unserer Studie soll, neben der Untersuchung der Wirkung von Bortezomib bei lokaler Anwendung in verschiedenen Konzentrationen, ebenfalls die Eignung von CPC als Medium zur Freisetzung von Bortezomib untersucht werden.

Zusammengefasst sollen folgende Fragestellungen im Rahmen unserer Studie untersucht werden:

- 1) Kommt es durch Bortezomib zu einer Stimulation oder Hemmung von Osteoklasten und Osteoblasten?
- 2) Kann die Defektheilung durch die lokale Applikation von Bortezomib stimuliert werden?
- 3) Eignet sich CPC als Medium zu Freisetzung von Bortezomib bei lokaler Anwendung im Knochen?
- 4) Welche Konzentration von Bortezomib erzielt ein bestmögliches Therapieergebnis?

Durch das bessere Verständnis des Einsatzes von Biomaterialien und deren Wirkung bei der Therapie, der immer häufiger werdenden, pathologischen Frakturen, beispielsweise beim Multiplen Myelom, wollen wir einen Beitrag leisten zu einer verbesserten Behandlung von komplexen Knochenbrüchen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Implantate**

Bei der Basis der Prüfsubstanz handelt es sich um Kalziumphosphat-Zement (CPC) mit Phosphoserin, der erstmals von Driessens et al. (1997) beschrieben wurde.

Während der Versuche wies der Zement eine Druckfestigkeit von etwa 27MPa und eine Durchlässigkeit von etwa 40vol-% auf (Schumacher et al., 2013a). Der CPC wurde bereits in in vitro (Schumacher et al., 2013b) und in vivo (Thormann et al., 2013) Studien beschrieben und untersucht.

Der Basiszement (InnoTere, Dresden, Deutschland) enthält 58%  $\alpha$ -Trikalziumphosphat ( $\text{CaCO}_3$ ), 24% Kalziumphosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ), 8,5% Kalziumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) und 8,5% Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). 10mg O-Phospho-L-Serin (Fluka, Buchs, Schweiz) pro Gramm Zement wurden im Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien (Technische Universität Dresden, Dresden, Deutschland) hinzugefügt. Alle Bestandteile wurden mit Phosphatpuffer (4%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) in einem Verhältnis von Flüssigkeit zu Pulver von 0,4 ml/g gemischt.

Bortezomib wurde dem Zement in drei unterschiedlichen Konzentrationen (100, 250 und 500 $\mu\text{g}$ ) zugesetzt. Im Anschluss wurde die Zementpaste in 1ml Spritzen gefüllt und durch einen Strahlregler in die Knochendefekte appliziert.

### **2.2 Versuchstiere und Tierhaltung**

Die Untersuchung wurde am lateralen Femurkondylus des linken Femurs des Hinterbeines von 4 Monate alten weiblichen Spague Dawley Ratten durchgeführt. Die Tiere stammen aus den Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany, 97633 Sulzfeld, Deutschland. Das Regierungspräsidium Darmstadt (Hessen, Deutschland) erteilte die Genehmigung für das Tierversuchsvorhaben nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998, BGBl I, 1105 (Az. V54-19c20/15-F31/38) am 26.03.2013.

## 2.3 Tiermodell

Es wurden operative Eingriffe an insgesamt 120 Versuchstieren durchgeführt. Die Tierzahlberechnungen wurden mit dem Computerprogramm „G\*Power“ Version 3.1 generiert.

Tierhaltung, Operationsvorbereitung sowie Operationen und Nachbeobachtungen bis zur Explantation und anschließenden Euthanasie der Tiere fanden in der Zentralen Forschungseinrichtung des Fachbereiches Medizin der Goethe-Universität Frankfurt statt.

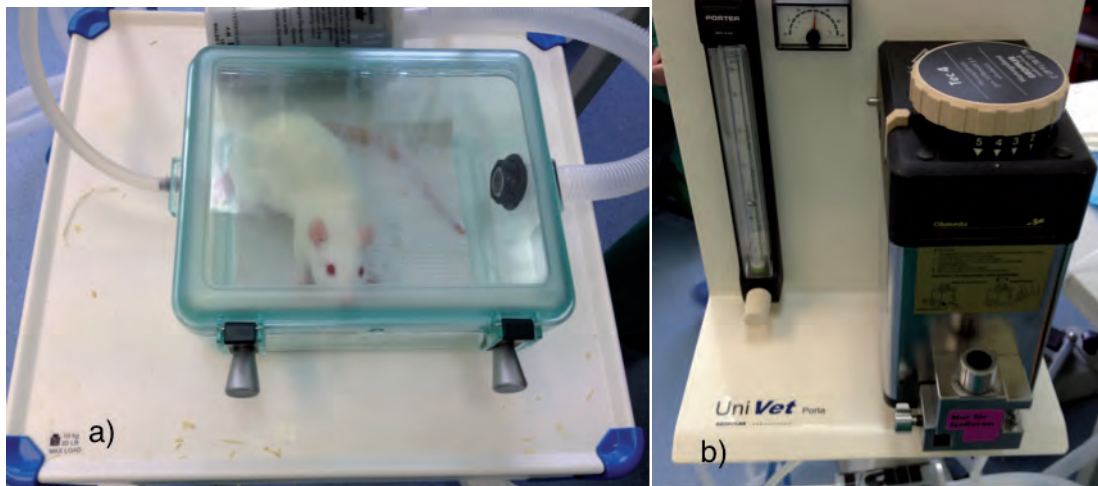
Es erfolgte die Einteilung der Tiere in verschiedene Versuchsgruppen.

- **Gruppe 1 (Leerdefekt):** Es erfolgte als Vergleichsgruppe bei sieben Tieren das Setzen eines Leerdefektes unilateral am Femurkondylus mit einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen
- **Gruppe 2 (CPC):** Bei sechs Versuchstieren erfolgte das Setzen eines Knochendefektes und die Implantation der oben beschriebenen Prüfsubstanz, die aus Kalziumphosphatzement besteht, unilateral am Femurkondylus mit einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen
- **Gruppe 3 (CPC+100µg):** Bei sieben Versuchstieren erfolgte bei sonst identischer Versuchsanordnung zu Gruppe 2, der Zusatz von 100 µg Bortezomib zu der Prüfsubstanz.
- **Gruppe 4 (CPC+250µg):** Bei sieben Versuchstieren erfolgte bei sonst identischer Versuchsanordnung, der Zusatz von 250µg Bortezomib zu der Prüfsubstanz
- **Gruppe 5 (CPC+500µg):** Bei sonst identischer Versuchsanordnung erfolgte bei fünf Tieren der Zusatz von 500µg Bortezomib zu der Prüfsubstanz

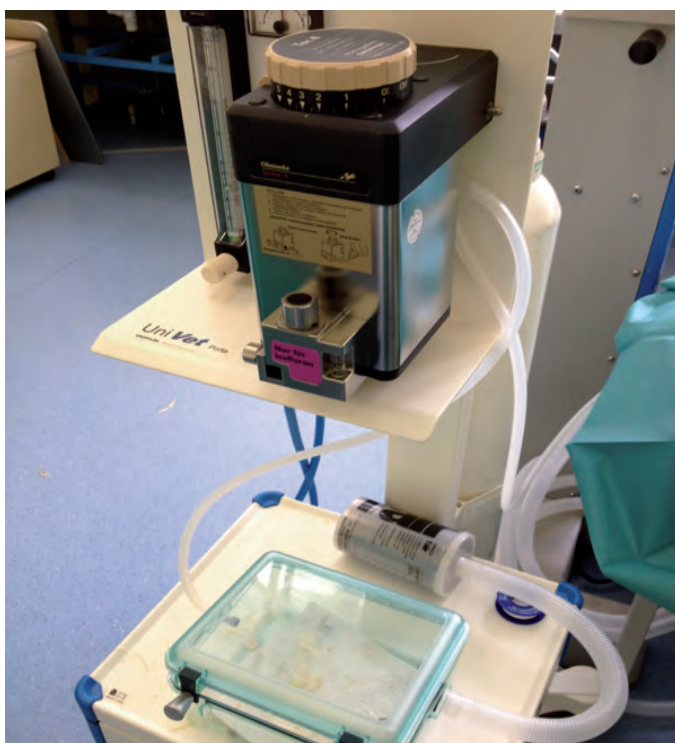
### 2.3.1 Narkose

Jedes Tier wurde in einer Narkosebox (Abbildung 9a) mittels Sauerstoff (0,5 l/min) und Isoflurane (4 vol. % zur Einleitung und 0.8-1 vol. % zur Narkoseerhaltung) vollnarkotisiert (Abbildung 9b).

Zur Analgesie erhielten die Tiere Dipidolor 37,5 µg/kg/h (0,9 mg/kg/d).



**Abbildung 8 a, b:** Versuchstier in der verwendeten Narkosebox (a), sowie das verwendete Narkosegerät (b). Die Gas-Narkoseeinleitung erfolgte mit Sauerstoff 0,5l/min und 4vol.% Isofluran. Zur Narkoseerhaltung wurden 0,8-1 vol.% Isofluran verwendet.



**Abbildung 9:** Versuchsaufbau mit Narkosegerät und Narkosebox. Die Tiere wurden einzeln aus den Gruppenkäfigen in die Narkosebox überführt. Die Narkosebox wurde manuell luftdicht verschlossen und die Narkose eingeleitet. Sobald eine entsprechende Narkosetiefe erreicht war wurde mit der Operationsvorbereitung begonnen.



### 2.3.2 Operation

Im Anschluss an die Narkotisierung der Versuchstiere erfolgte präoperativ in Rechtsseitenlage die Rasur des linken Femurs (Rasierer für Labornager, Indulab Model 1574) welcher im Anschluss mit dem Desinfektionsmittel Braunol mehrfach gründlich desinfiziert wurde. Das Versuchstier wurde in Rechtsseitenlage gelagert und das Operationsgebiet steril abgedeckt.

Die kontralaterale Seite blieb unberührt. Es wurde ein metaphysäres Defektmodell am distalen Femur verwendet.

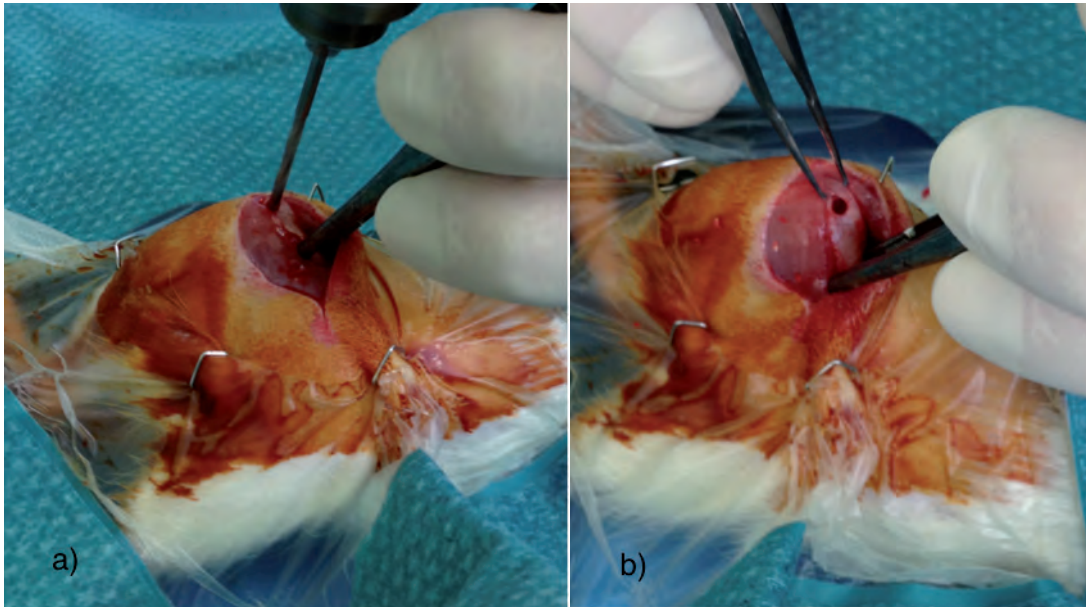
Bei jedem Tier wurde nach Rasur und Desinfektion eine longitudinale Hautinzision am distalen Femur vorgenommen. Die Haut wurde lateralseits vom mittleren Oberschenkel bis zum Knie auf einer Länge von ca. 3 cm inzidiert.

Die Fascia lata wurde auf gleicher Länge gespalten und die Muskulatur zwischen dem M. biceps femoris und dem M. vastus lateralis femoris zur Darstellung des knöchernen Femurs gespalten. Mittels eines Bohrers mit 2,5 mm im Durchmesser wurde unter Wasserkühlung ein 4mm tiefer kreisförmiger Defekt im Bereich des lateralen Femurkondylus gesetzt. Der Defekt wurde anhand der Randomisierungsliste entweder leer belassen als Kontrollgruppe, oder mit dem entsprechenden Biomaterial gefüllt.

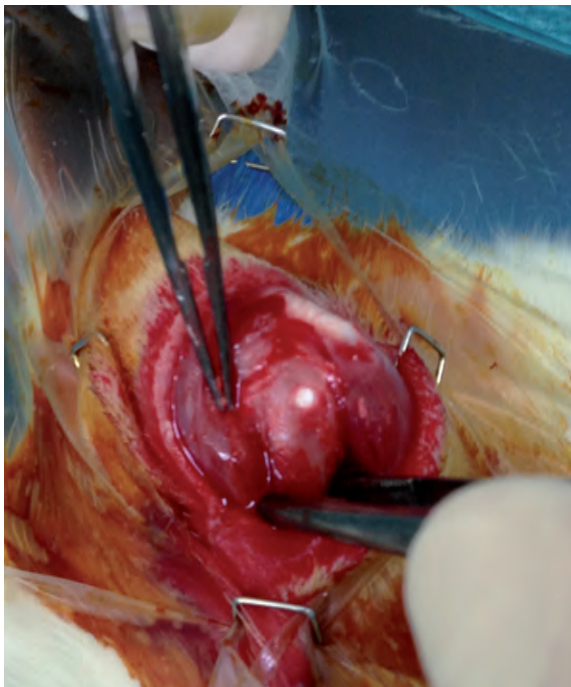
Es erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss der Wunde. Der Hautverschluss erfolgte durch Naht und Wundklammern. Zusätzlich wurde die Operationswunde mit Nobecutan-Spray abgedeckt.

Die Belastbarkeit des Femurs blieb vollständig erhalten.

Die Tiere erhielten postoperativ eine Schmerzbehandlung mit Dipidolor 37,5 µg/kg/h (0,9 mg/kg/d) für 5-7 Tage über das angebotene Trinkwasser.



**Abbildung 10 a,b:** Das Versuchstier wurde in Linksseitenlage gelagert. Nach Rasur und sterilem Abwaschen sowie Abdecken des Operationsgebietes erfolgte die Inzision über der lateralen Femurkondyle. Nach Freipräparieren der Femurkondylen erfolgt das Setzen eines 4mm tiefen Defektes mittels eines 2,5mm Bohrers (a). Der damit erzeugte Leerdefekt kommt in b) zur Darstellung.



**Abbildung 11:** In den Gruppen 2 bis 5, in denen CPC, bzw. CPC mit verschiedenen Konzentrationen Bortezomib untersucht wurde, erfolgte nach Setzen des Defektes die Auffüllung des mit dem entsprechenden Gemisch. Das CPC passt sich exakt in den Defekt ein und überragt das Niveau des Defektes nicht.

### **2.3.3 Postoperative Nachbehandlung**

Die Versuchstiere wurden postoperativ bis zum Wiedererlangen des vollen Bewusstseins in einer warmen und leicht kontrollierbaren Umgebung gehalten. Um zu gewährleisten, dass die operierten Tiere sich unter der Schmerzmedikation nicht gegenseitig verletzen, wurden sie für sieben Tage in Einzelhaltung gehalten. Nach diesem Zeitraum konnten die Ratten in ihren ursprünglichen Gruppen im Typ IV Käfig mit erhöhtem Deckel umgesiedelt werden.

Es wurde in täglichen Kontrollen das Verhalten und Allgemeinbefinden der Tiere von Tierärzten und Tierpflegern beurteilt und dokumentiert. Der Heilungsverlauf der Operationswunden wurde täglich kontrolliert und Bewegungsaktivität und Körpergewicht der Tiere täglich registriert. Besonderes Augenmerk wurde auf die Belastung der operierten Extremität gelegt, um ihre Belastung durch das Tier und eventuell dadurch entstehende Komplikationen, wie z.B. Dislokation und Fehlstellungen, zu erkennen.

Des Weiteren wurden die Tiere täglich anhand eines Score Sheets bewertet, mit dem das Allgemeinbefinden kontrolliert und dokumentiert wird, sowie die Futteraufnahme und die Belastung der operierten Gliedmaße.

An Tag 160, d.h. 30 Tage nach der Femur-Operation, wurden die Tiere in CO<sub>2</sub>-Narkose euthanasiert.

Nach der Euthanasie wurden die operierten Femora entnommen und zur Einbettung markiert.

## **2.4 Probenaufarbeitung**

### **2.4.1 Einbettung**

Die Einbettung der Proben wurde im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Für das Einbetten wurden die Femura nach Fixierung in 4% Paraformaldehyd, Spülen und Entwässern nach Herstellervorgaben in Technovit 9100 (Fa Heraeus Kulzer, Werheim, Deutschland) eingebettet und 5 µm dicke Knochenschliffe angefertigt.

### **2.4.2 Trenn-Dünnschliff-Technik**

Die Einbettung im Kunststoff auf der Basis von Methylmethacrylat (Technovit 9100, Heraeus Kulzer, Werheim, Deutschland) und die Trenn-Dünnschlifftechnik ermöglichten die histologische Auswertung von unentkalktem und nicht schneidbarem Knochengewebe. In der vorliegenden Untersuchung dienten die Schnitte für die lichtmikroskopische Untersuchung,

sowie histomorphometrische Auswertung und enzymhistologische Untersuchungen der mit Implantat ausgefüllten Knochendefekte.

Die Herstellung von Dünnschliffen erfolgte mittels des Exakt-Trennschleifsystems 310 CL (Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Die 5µm Schnitte wurde an einem RM2155 Mikrotom durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Schnitte auf Objektträger überführt.

### **2.4.3 Histologisch-histomorphometrische Untersuchungen**

#### **2.4.3.1 TRAP**

Die Schnitte wurden zunächst mittels MEA (2-Methoxyethylacetat) und einer absteigenden Alkoholreihe sowie destilliertem Wasser entplastet.

Daran schloss sich eine Spülung mittel 0,1m Acetatpuffer pH5,2 an. Nach Umfahren der Schnitte mittels Pap-Pen wurden die Schnitte für 90 Minuten gefärbt. Nach Spülen des Schnittes mit Aqua dest für 3min wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Fa. Shandon Inc, Pittsburgh) durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte nach Spülen in Leitungswasser und Aqua dest mit verflüssigter Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

#### **2.4.3.2 Alkalische Phosphatase**

Nach Entplasten der Schnitte in MEA (Fa. Merck N0. 8.06021.1000) und absteigender Alkoholreihe sowie Aqua Dest, erfolgte die Spülung der mit Pap-Pen umfahrenen Schnitte mittels Tris-Puffer für 10 Minuten. Im Anschluss erfolgte das Färben der Schnitte mit Phosphatase-Substrat (BCIP/NBT (Fa. KPL, 50-81-08) für 2 Stunden bei 37°C in der feuchten Kammer. Nach dem Spülen der Schnitte mit Aqua dest erfolgte das Gegenfärben mit Kernechtrot für 10 Minuten.

Nach erneutem Spülen mit Aqua dest und Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte mittels Depex (Fa. Serva No. 18243) eingedeckelt.

#### **2.4.3.3 Immunhistochemie**

##### **2.4.3.3.1 OPG**

Für die immunhistochemische Analyse der Regenerate wurden Parafinschnitte in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, rehydriert und anschließend in Tris-NaCL Puffer (pH 7,4) mit 0,025% Triton X (TBS-Waschpuffer) gespült. Die endogene Peroxidase wurde

durch Inkubation in 3% $\text{H}_2\text{O}_2$  in TBS blockiert. Im Anschluss erfolgte nach erneuter Spülung die Vorverdauung der Schnitte mittels Citratpuffer pH6,0 für eine Stunde bei 60°C.

Die Parafinschnitte wurden anschließend in Tris-NaCL Puffer (pH 7,4) mit 0,025% Triton X (TBS) und 3% $\text{H}_2\text{O}_2$  in TBS gespült. Daran schloss sich die Inkubation mit dem primären Antikörper OPG (Abbiotec, in Verdünnungspuffer 1:200) über Nacht bei 4°C an. Nach erneutem Spülen mit TBS wurden die Schnitte 30 Minuten in der feuchten Kammer mit 50 $\mu\text{l}$  Polymer Rabbit (Dako EnVision) für 30 Minuten inkubiert.

Nach Spülen mit einem TBS und Aqua dest wurde das Polymer durch Färben mit frisch zubereitetem Nova Red (substrate kit for peroxidase; Fa. Vektor) für 17 Minuten sichtbar gemacht. Der besseren Orientierung wegen folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (1:3 mit Bidest). Erneutes Spülen mit Aqua dest und Leitungswasser (10min) und erneut Aqua dest (5min). Anschließend erfolgte das Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und das Eindeckeln mittels Depex.

#### **2.4.3.3.2 BMP2**

Die Parafinschnitte wurden über MEA und ein 10%iges Aceton entparaffiniert, rehydriert und anschließend mit TBS gewaschen. Daran schloss sich die Blockade der endogenen Peroxidase durch 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 45 Minuten an. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper BMP2 (Acris; Verdünnung 1:100) für 60 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung mit TBS für 10 Minuten wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit biotinyliertem anti-Maus Sekundärantikörper in TBS mit 1% BSA und 12,5% Rattenserum inkubiert. Es folgte die Inkubation mit 50 $\mu\text{l}$  Polymer Rabbit (Dako EnVision) für 30min in der feuchten Kammer. Die Schnitte werden mehrfach gespült mit Waschpuffer (2x5min) und Aqua dest (2x2 min) vor dem Färben mit DAB (DAB aus Kit: DAKO EnVision K4006, 1ml DAB+ Substrate Buffer + 1 Tropfen DAB+ Chromogen; 4°C) für 17 Minuten. Vor dem Gegenfärben mit Hämatoxylin für 30 Sekunden wurden erneut mehrfache Spülungen durchgeführt. Abschließend erfolgt das Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe sowie das Eindeckeln mit Depex.

#### **2.4.3.3.3 RANKL**

Analog zu der OPG Immunhistochemie wurden die Parafinschnitte über MEA und eine absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, rehydriert und anschließend mit TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Vorverdauung mittels Citratpuffer pH 6,0 für 30 Minuten bei 60°C.

Die erneuten Spülungen und die Blockade der endogenen Peroxidase mittels 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden ebenfalls analog zu OPG durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde RANKL (Acris, 1000µg/ml) verwendet. Die Schnitte wurden mit einer Menge von 50µl primärem Antikörper RANKL (Acris, 1000µg/ml) in einer Verdünnung von 0,6µg/ml für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtekammer inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-rabbit Antikörper (Fa. Vector, goat; antirabbit; 8µl Antikörper + 500µl Serum + 3492µl BSA (Bovine serum albumin) in TBS (Tris buffered saline)) verwendet und die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit selbigem Inkubiert. Das Auftragen von Vectastain ELITE ABC (Fa. Vector, PK 6100) und Inkubation für 30 Minuten in einer Dunkelkammer sowie das Visualisieren der Peroxidase mittels Nova Red (substrate kit for peroxidase; Fa. Vektor) und die Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxylin (Fa. Shandon), das Spülen und Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe schlossen den Arbeitsschritt ab.

#### **2.4.3.3.4 ASMA**

Analog zu der BMP-2 Immunhistochemie wurden die Parafinschnitte über MEA und Aceton entparaffiniert, rehydriert und anschließend in TBS gewaschen sowie die endogene Peroxidase durch 45-minütige Inkubation mit 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS blockiert. Als primärer Antikörper wurde ASMA (Fa. DAKO M0851; 4°C) in Verdünnungspuffer (Fa. DAKO No. S3022, 4°C) 1:1000 verwendet und die Schnitte in selbigem für 60 Minuten inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte, vom Blockieren der Peroxidase, über die Inkubation mit Polymer, dem Färben mit DAB und dem Gegenfärben mit Hämatoxylin werden analog zu den Arbeitsschritten der BMP Immunhistochemie durchgeführt. Das Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe sowie das Eindeckeln mit Depex beenden diesen Arbeitsschritt.

#### **2.4.3.3.5 ED1**

Das Entplasten und Spülen erfolgt analog zu der ASMA Immunhistochemie. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper monoklonaler ED-1 in Verdünnungspuffer 1:3000 (Fa. Dako No. S3022, 4°C) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Spülen mit TBS erfolgt das Blockieren mit Rattenserum in TBS/BSA (1%BSA in TBS aliquotiert bei 20°C + 12,5% Rattenserum) für 10 Minuten. Die Inkubation mit Polymer Mouse (Labelled Polymer aus Kit: Dako EnVision K4006) sowie die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Shandon Instant-Hämatoxylin; Fa. Thermo Scientific No. 6765015) 1:2 verdünnt mit Bidest für 30 Sekunden sowie die Spülung und Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgen analog zu der ASMA Immunhistochemie. Abschließend

erfolgt auch hier das Eindeckeln mit Depex.

#### **2.4.3.4 MOVAT**

Mit der MOVAT-Pentachrom-Färbung können alle Komponenten des Bindegewebes in einer einzigen Färbung dargestellt werden. Die Färbung zählt in der klinischen Routine zu den Sonderfärbungen. Sie wird üblicherweise als Knorpelfärbung, zur Darstellung von Proteoglycan- und Glycosaminoglycan-reichen Geweben und zur Darstellung elastischer Fasern verwendet. Das Ergebnis ist eine farbenprächtige sehr fein differenzierende Färbung. Das Ergebnis der MOVAT-Pentachrom-Färbung zeigt folgende Differenzierung: Zellkerne blauschwarz, Muskeln: rot, Grundsubstanz: blau, mineralisiertes Gewebe: gelb, Osteoid: hellrot, Knorpel: blau-grün, elastische Fasern: rot, Knochenmark: dunkelrot.

Das Herstellen der MOVAT-Färbung erfolgte zunächst durch das Entparaffinieren und Rehydrieren über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe. Daran schloss sich das Färben in Alcain Blue Solution (Chroma) für 40 Minuten an sowie eine Spülung in Leitungswasser und ein darauf folgendes Einlegen der Schnitte in alkalisches Ethanol (10ml Ammonium Hydroxyd + 90ml Ethanol 95%) für 60 Minuten an.

Das Färben mit Eisenhämatoxylin (40ml Lösung A (Firma Roth Best. Nr. X906.1 500ml) + 40ml Lösung B (Firma Roth Best. Nr. X907.1 500ml)) erfolgte im Anschluss für 14 Minuten nach erneutem Spülen in Leitungswasser.

Nach erneuter Spülung in Aqua dest und Leitungswasser führten wir die Färbung mit Crocein-Fuchin Lösung für 6 Minuten durch. Die Entfärbung in Phosphormolibdänsäure für 9 Minuten (5g Phosphormolibdänsäure (Phosphorwolframsäure; Wolframto-phosphoracid-Hydrat) in 100ml destilliertem Wasser) folgte auf eine Spülung in 0,5%iger Essigsäure (Eisessig von Merck Best. Nr. 1.00063.1000 in destilliertem Wasser) für 1 Minute. Nach einer abschließenden Spülung in 0,5% Essigsäure für 40 Minuten im Schüttler wurde dieser Arbeitsschritt mit dem Entwässern und Eindeckeln abgeschlossen.

#### **2.4.3.5 Probenauswertung**

Nach Abschluss der Färbungen wurden die Proben unter einem Axioplan 2 Imaging Mikroskopsystem (Carl Zeiss, Deutschland) untersucht, welches mit einer Leica DC 500 Kamera (Leica, Bensheim, Deutschland) und Leica IM 1000 Software ausgestattet ist.

Mithilfe dieser Ausstattung wurden von den Schnitten, die auf ALP, TRAP, BMP und ASMA untersucht wurden, in 10facher Vergrößerung Bilder erstellt, die im Anschluss mittels Adobe Photoshop Software und Photomerge zusammengesetzt wurden.

Die Proben, die auf ED1, OPG und RANKL untersucht wurden, sowie die MOVAT und Kossa Färbungen, wurden in 5facher Vergrößerung in selber Weise fotografiert und zusammengefügt. In selber Weise wurde mit dem Leerdefekt verfahren.

Detailaufnahmen mit 100facher Vergrößerung wurden zudem von ASMA, ED1, BMP-2, OPG und RANKL durchgeführt. Bei den Proben, die auf TRAP, ED1, OPG, RANKL, ASMA und ALP untersucht wurden, wurde zudem eine Histomorphometrie durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde, mittels Adobe Photoshop eine area of interest festgelegt, die den Defekt umgab. Diese wurde bei einer 10fachen Vergrößerung auf 2337x2337 Pixel festgelegt, bei 5facher Vergrößerung auf 1225x1225 Pixel.

Die angefärbten Zellen wurden im Falle von TRAP, ED1, OPG und RANKL einzeln ausgezählt mittels Adobe Photoshop. Im Falle von ALP wurde die Fläche der angefärbten Zellen berechnet, durch Markierung der angefärbten Bereiche in Adobe Photoshop. Bei der ASMA Färbung konnten die einzelnen Gefäßanschnitte in dem oben genannten Fotobearbeitungsprogramm markiert werden.

Im Fall von BMP-2 erfolgte ein deskriptiver Vergleich der Färbungen in den verschiedenen Gruppen.

### **2.4.3.6 Statistik**

Zur Analyse der Untersuchungen diente eine univariante Varianzanalyse (ANOVA von Englisch analysis of variance).

Es handelt sich um ein statistisches Auswerteverfahren für Mittelwertvergleiche, das bei mindestens intervallskaliertem Datenmaterial anwendbar ist.

Bei der Varianzanalyse wurde untersucht, ob sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen unterscheiden. Dadurch konnte man ermitteln, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestehen.

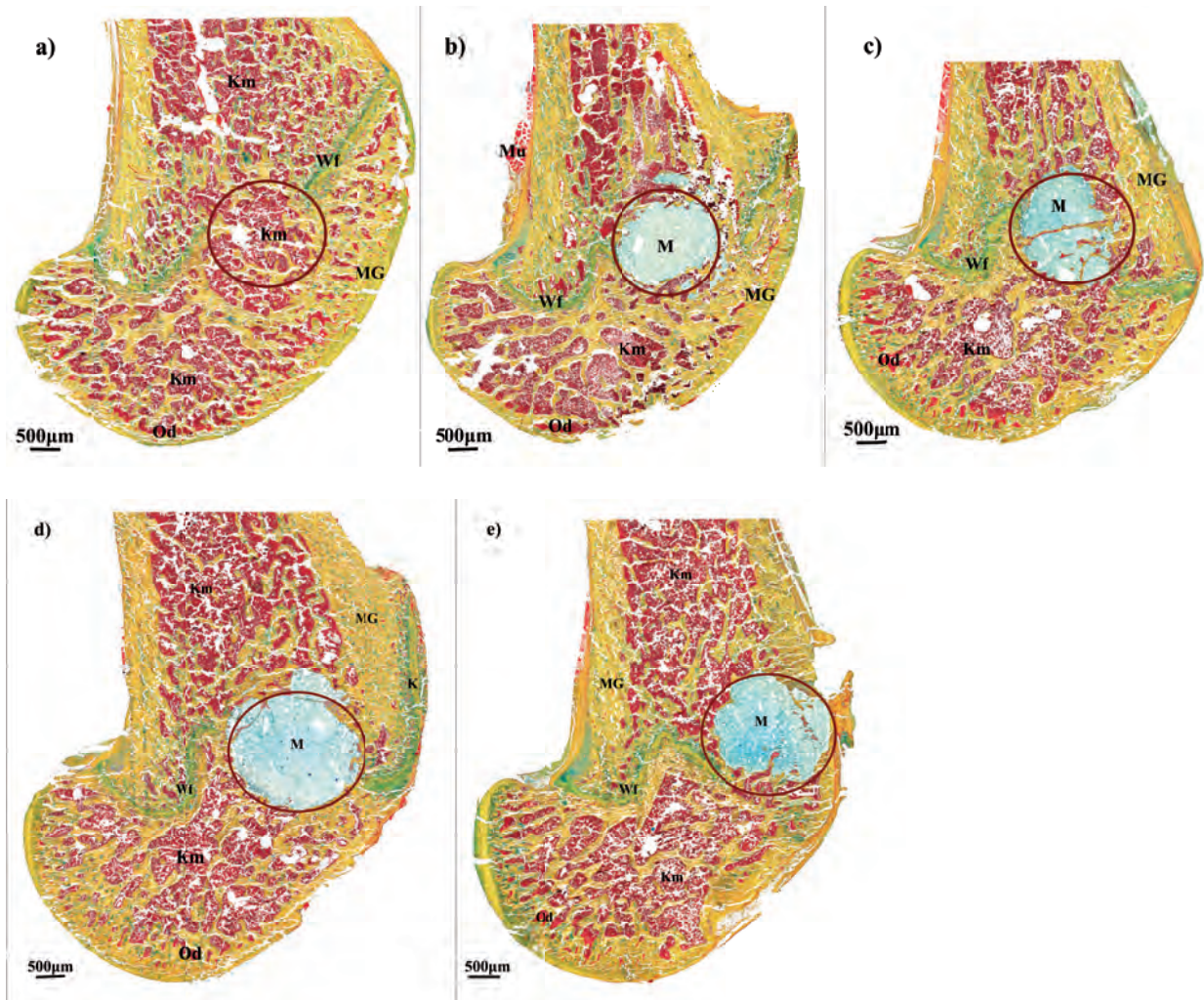
Die Analyse der histomorphometrischen Messwerte erfolgte weiterhin zusätzlich anhand des Games-Howell Test. Es handelt sich dabei um einen Post-Hoc Test. Dabei handelt es sich um einen Test für paarweise Vergleiche zwischen Gruppen, sofern keine Varianzhomogenität gegeben ist. Am häufigsten wird der Test angewandt um Mittelwertsunterschiede zwischen zwei Experimental-Stichproben zu untersuchen.

Eine statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen. Wenn der ermittelte Wert über 0,05 liegt, konnte man davon ausgehen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen besteht.



### 3 Ergebnisse

Bei den Überprüfungen, der mittels Elektronenmikroskop durchgeführten Aufnahmen, zeigten sich, in den von uns durchgeführten Untersuchungen, die folgenden Ergebnisse:



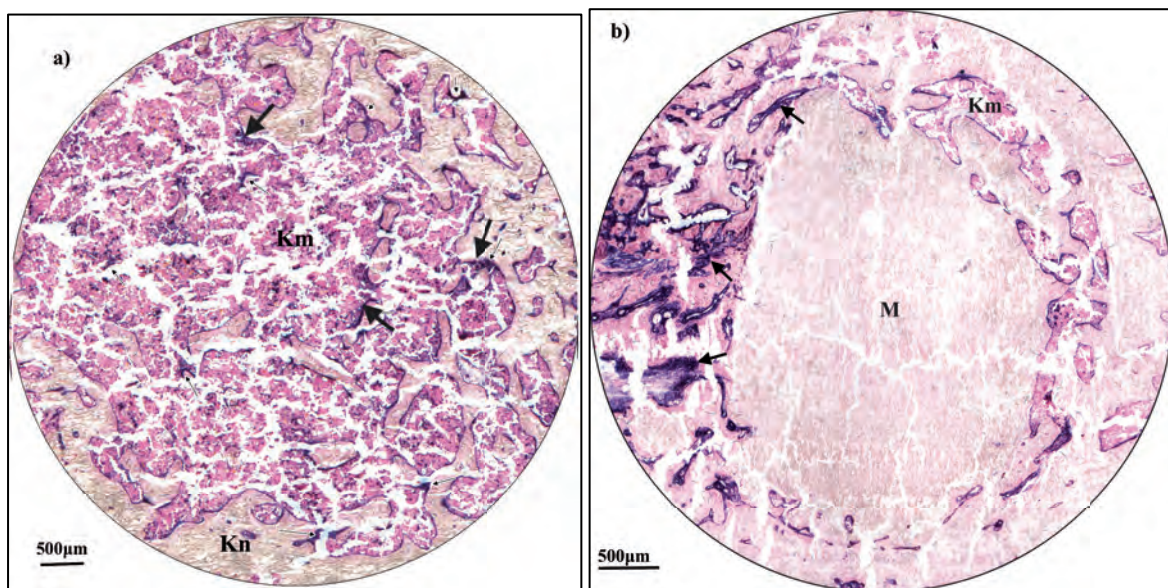
**Abbildung 12 a-e:** Movat-Pentachrom Foto-Mikrografien der Rattenfemura in der Gruppe des (a) Leerdefektes, (b) CPC, (c) CPC mit 100µg Bortezomib, (d) CPC mit 250µg Bortezomib und (e) CPC mit 500µg Bortezomib. Die area of interest wurde rot umrandet und dessen Lage im Femur so veranschaulicht. Die Femurkondylen kommen am distalen Bildrand zur Darstellung. Der Schaft reicht nach proximal. In den Übersichtsaufnahmen lässt sich bereits eine unterschiedliche Knochenneubildung erahnen, abhängig von der verwendeten Bortezomib-Konzentration. Das Material (M) CPC kommt hellblau in der Area of interest zur Abbildung. Das Knochenmark (Km) zeigt sich dunkelrot, wohingegen das Osteoid hellrot zur Darstellung kommt. Die Wachstumsfuge (Wf) wird grün angefärbt, wie auch der lateral am Femurschaft dargestellte Knorpel (K). Das mineralisierte Gewebe (MG) kommt gelb zur Darstellung.

Schon in der Übersichtsfärbung mittels MOVAT kann man die unterschiedlichen Auffüllungen der Defekte der Femura in den einzelnen Gruppen erkennen. In Abbildung a) zeigt sich eine beinahe vollständige Auffüllung des Defektes mit elastischen Fasern. In den Gruppen b)-e) zeigt sich das CPC in hellblau. Dieses ist je nach Konzentration des Bortezomib in unterschiedlicher Art und Weise mit den umgebenden Strukturen verwachsen. Der Defekt hat sich unterschiedlich aufgefüllt. Um Unterschiede in Qualität und Quantität beurteilen zu können erfolgte die Auswertung der weiteren Färbungen.

### 3.1 Histomorphometrie ALP

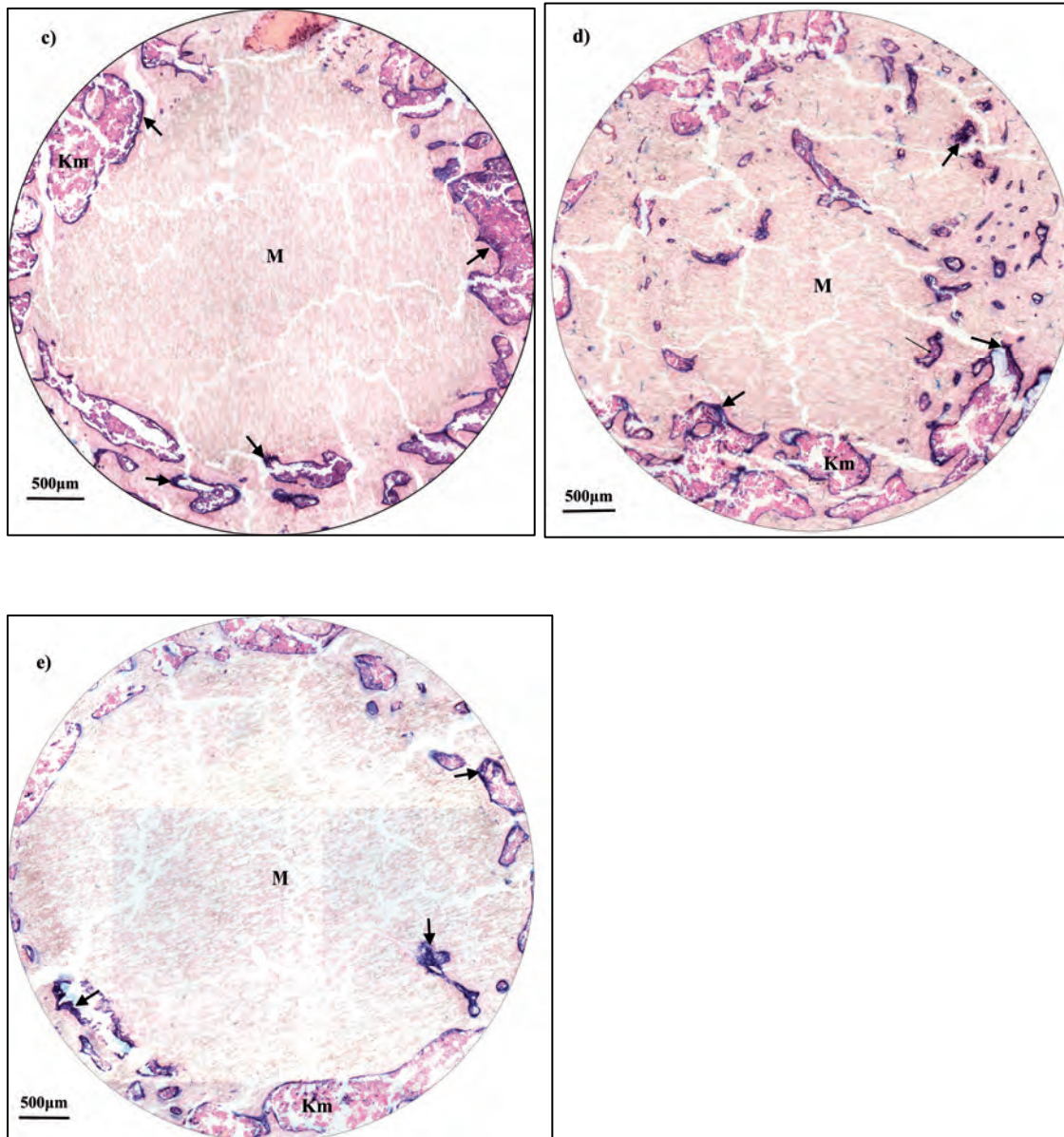
In der histomorphometrischen Untersuchung auf ALP erfolgte die Bestimmung der Fläche der angefärbten Zellen mit Hilfe von Adobe Photoshop. Der Nachweis von alkalischer Phosphatase signalisiert eine vermehrte Osteoblastenaktivität.

Deskriptiv ließ sich in den Übersichtsaufnahmen in 10facher Vergrößerung, sowie im Falle des Leerdefektes in 5facher Vergrößerung feststellen, dass ALP vermehrt in dem, das CPC umgebende Gewebe nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 13 a-b** Immunhistochemischer Nachweis von ALP in der Area of interest. Im Leerdefekt (a) zeigt sich in 5facher Vergrößerung ein Nachweis von angefärbtem ALP ( siehe → ) in Osteoblasten in der gesamten Area of interest, jedoch in geringer Exprimierung. Zentral zeigt sich im ehemaligen Defekt der Nachweis von Knochenmark (Km). In dem mit CPC aufgefüllten Defekt (b) zeigt sich kein Nachweis von ALP im Material (M) CPC selbst, jedoch im das CPC umgebenden Gewebe. Die ALP angefärbten Osteoblasten wurden mittels Pfeilen ( → ) markiert. Selbige wurden verwendet um die Osteoblastenoberfläche in Relation zur Knochenoberfläche zu setzen.

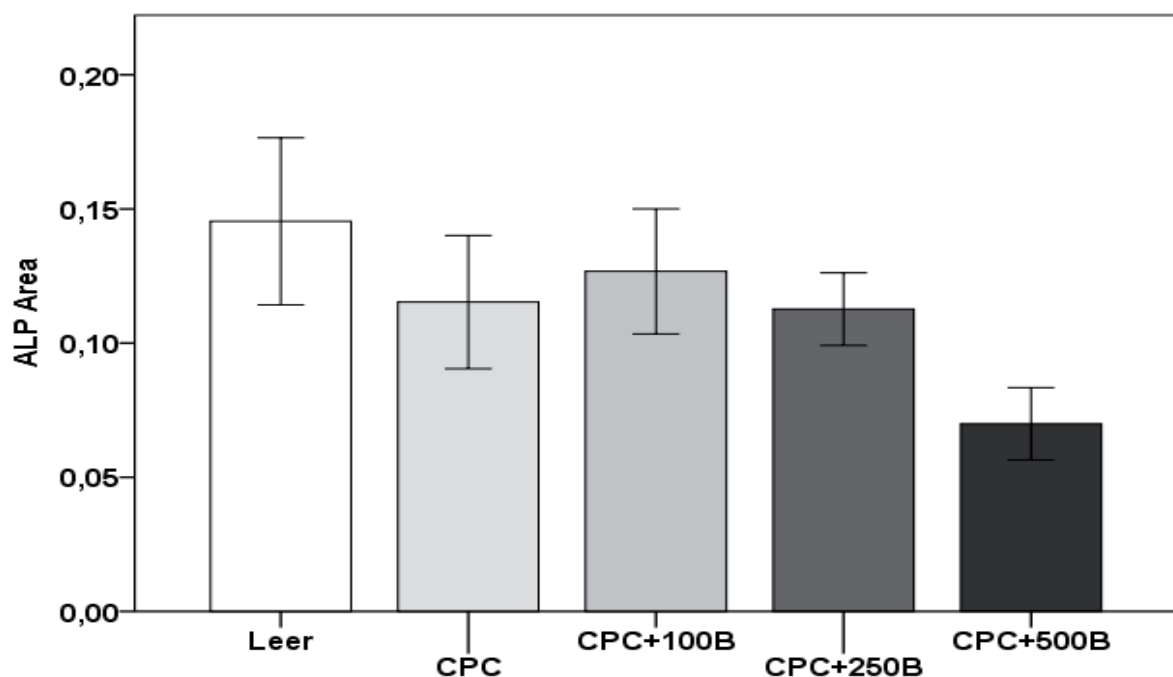




**Abbildung 13 c-e** Immunhistochemischer Nachweis von ALP in der Area of interest. In Abbildung c zeigt sich der Nachweis von ALP in der Umgebung von CPC mit 100µg Bortezomib versetzt als Nachweis von Osteoblastenaktivität. Entsprechende Nachweise von ALP in der CPC umgebenden Region zeigen sich bei einem Auffüllen des Defektes mit CPC und 250µg Bortezomib (d), sowie bei CPC mit 500µg Bortezomib (e). In Abbildung d) zeigt sich ein Einwachsen von Osteoblasten in den mit CPC aufgefüllten Defekt (1). Das angefärbte ALP stellt sich violett dar und wurde mit Pfeilen markiert. Zentral ist das Material (M) CPC abgebildet. Das Knochenmark (Km) kommt im Rand des Defektes zur Abbildung.

Im CPC selbst konnte kein ALP Nachweis erbracht werden. Der Leerdefektes (Abbildung 14a) konnte vollständig mit Gewebe aufgefüllt werden und es kam im gesamten ehemaligen Defektareal zu einem Nachweis von ALP. Dieser war im Vergleich nicht so ausgeprägt, wie in der das CPC umgebenden Region, in den anderen vier Gruppen. Dies lässt Rückschlüsse zu auf eine verminderte Osteoblastenaktivität. Da sich die Osteoblastenaktivität in den Gruppen Abbildung b)-e) lediglich randständig des Defektes zeigt, konnte kein signifikanter Unterschied mittels Games-Howell Test zwischen der Kontrollgruppe (Abbildung 14 a) (Leerdefekt), dem reinen CPC, sowie den verschiedenen Bortezomibkonzentrationen in CPC (Abbildung 14 b)-e)) nachgewiesen werden.

In der statistischen Untersuchung, mittels Games-Howell Test, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Leerdefekt), dem reinen CPC, sowie den verschiedenen Bortezomibkonzentrationen in CPC gezeigt werden (Abbildung 15).



**Abbildung 14:** Dargestellt ist die nachgewiesene Fläche in der ALP angefärbt wurde. Abgebildet sind die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median in den einzelnen Gruppen. In der grafischen Darstellung des Nachweises von APL nach Behandlung mit Bortezomib in verschiedenen Konzentrationen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Die Menge des nachgewiesenen ALP ist im Leerdefekt am höchsten und in der Gruppe mit 500 µg am geringsten. Jedoch erreichten die Werte keine Signifikanz.

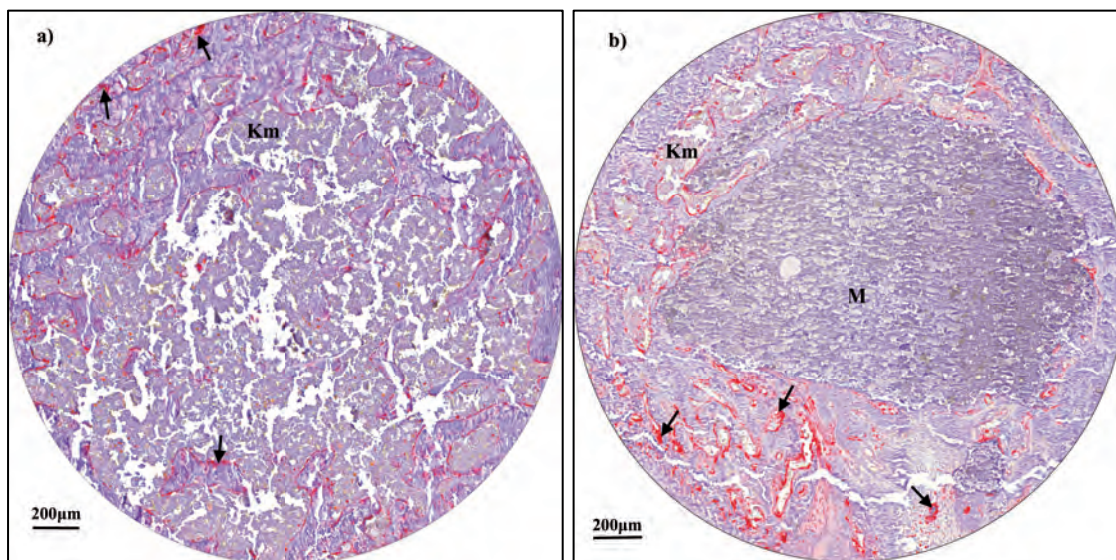
### 3.2 Histomorphometrie TRAP

Osteoklasten setzen im Rahmen der Knochenresorption Tartrat resistente alkalische Phosphatase (TRAP) frei. In den Färbungen zum Nachweis von TRAP konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

Die Nachweisbarkeit von TRAP war im Leerdefekt (Abbildung 16 und 17 a) signifikant geringer, als, in der CPC Gruppe ( $p=0,035$ ) Abbildung 16 und 17 b), sowie in den Gruppen mit CPC + 100 $\mu$ g Bortezomib ( $p=0,024$ ) (Abbildung 16 und 17 c) und CPC + 250 $\mu$ g Bortezomib ( $p=0,042$ ) (Abbildung 16 und 17 d).

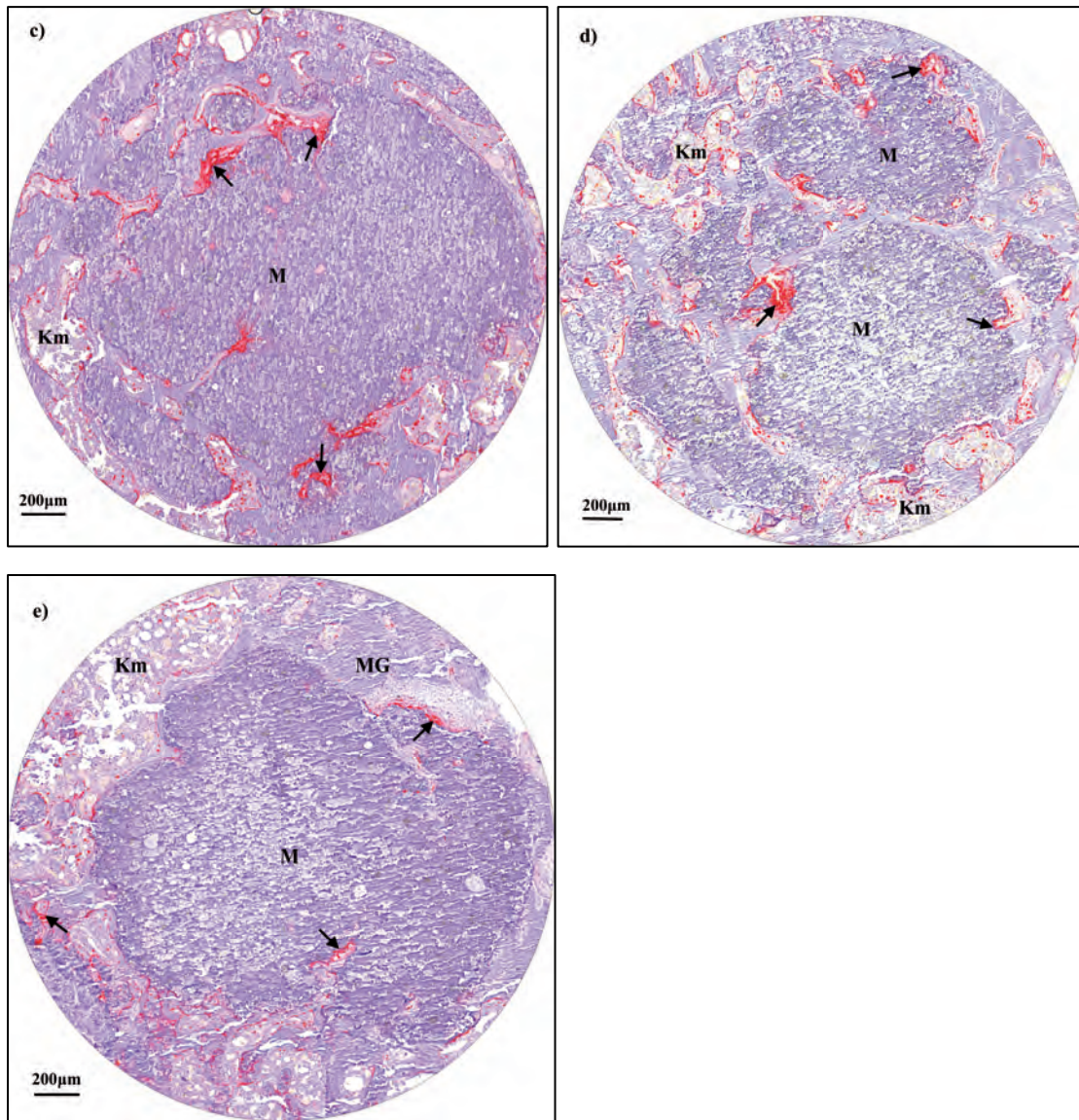
Keine Signifikanz konnte erreicht werden beim Vergleich der einzelnen Gruppen mit der mit 500  $\mu$ g Bortezomib therapierten Gruppe (Abbildung 16 und 17 e). Innerhalb der Gruppen CPC, CPC + 100 $\mu$ g Bortezomib und 250 $\mu$ g Bortezomib konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Der höchste Nachweis von TRAP konnte jedoch, auch ohne statistische Signifikanz aufzuweisen, in der Gruppe mit 100 $\mu$ g Bortezomib (Abbildung 16 und 17 c) erreicht werden.

Bei Steigerung der Konzentration von Bortezomib war der Nachweis zunehmend rückläufig.



**Abbildung 15 a) und b):** In der Untersuchung des Leerdefektes (a) zeigt sich ein geringerer Nachweis von TRAP ( $\rightarrow$ ) im Vergleich zu der Gruppe der CPC (M) in den Defekt implantiert wurde (b). In der durchgeführten Färbung kommt das TRAP rot zur Anfärbung. Das TRAP dient als Nachweis von vermehrter Osteoklastenaktivität.



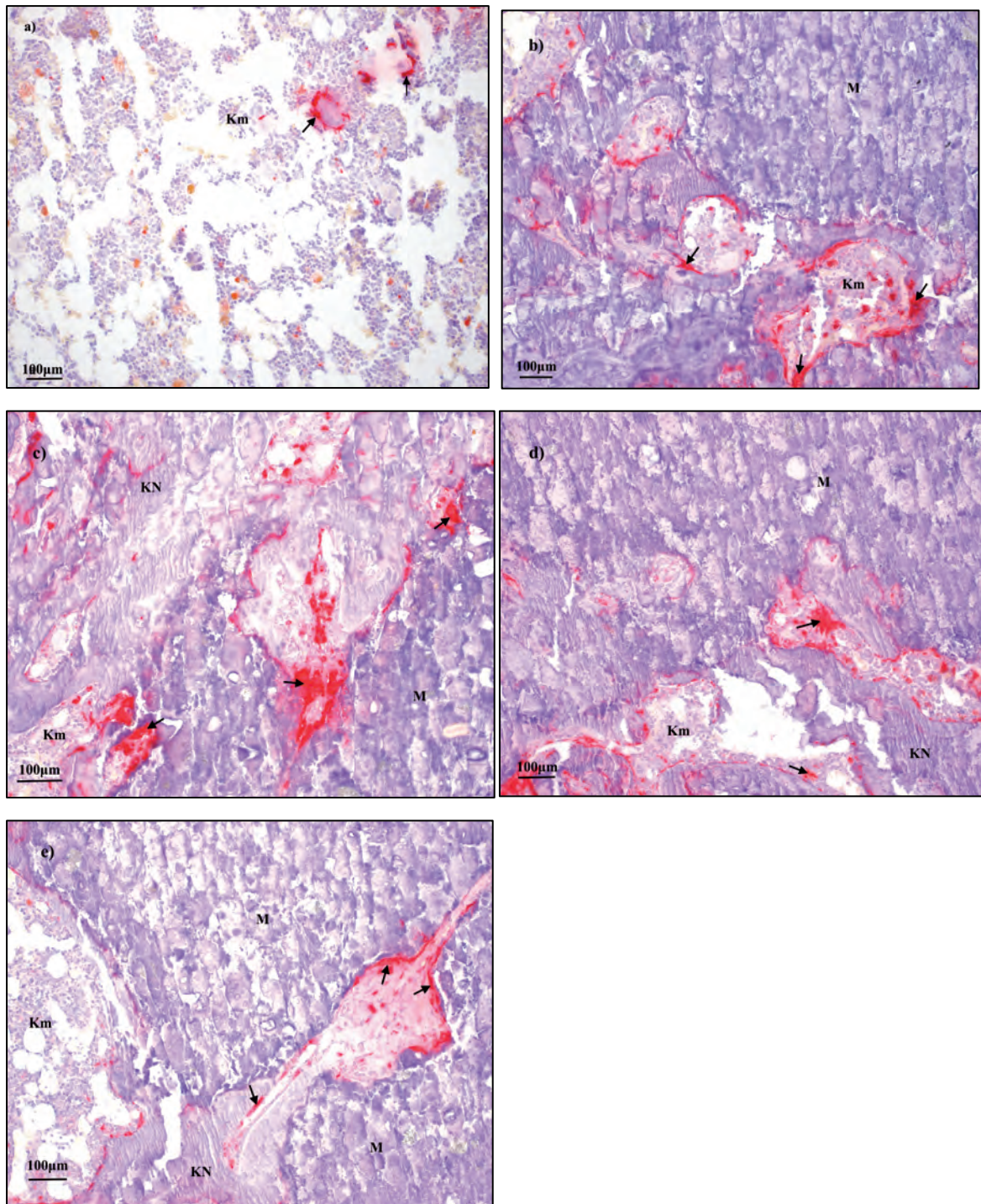


**Abbildung 15 c)-e):** Die einzelnen mit Pfeilen markierten TRAP angefärbten Osteoklasten wurden immunhistochemisch ausgezählt. Dabei zeigte sich, wie in den Übersichtsaufnahmen in 10facher Vergrößerung deutlich wird, ein signifikant erhöhter Nachweis von TRAP (→) in den Gruppen b-e, im Vergleich mit dem Leerdefekt (a). Dies ist ein eindeutiger Nachweis für eine erhöhte Osteoklastogenese in den Gruppen 2-5.

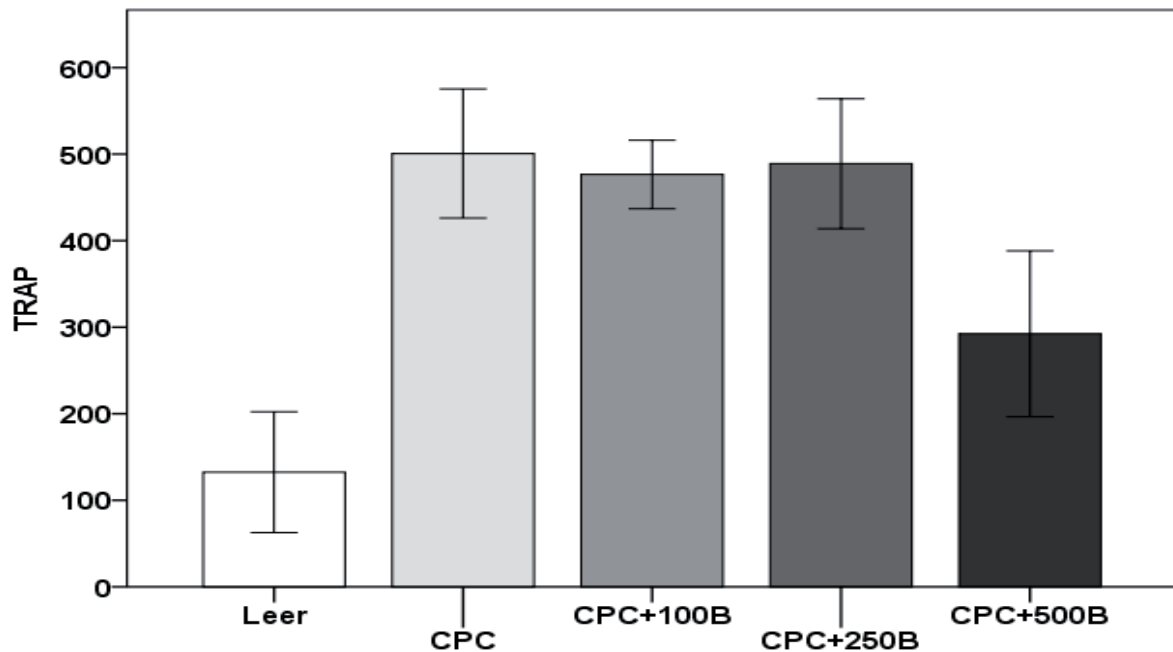
- a) Leerdefekt,
- b) CPC
- c) CPC + 100µg Bortezomib
- d) CPC + 250µg Bortezomib
- e) CPC + 500µg Bortezomib

Entscheidende Strukturen wurden wie folgt markiert: M, Biomaterial (CPC); Km, Knochenmark; MG, Mineralisiertes Gewebe.





**Abbildung 16 a)-e)** Detailaufnahmen der TRAP Färbungen in 20-facher Vergrößerung in den Gruppen a)-e) entsprechend der vorherigen Grafik. Die rot angefärbten TRAP Areale (→) sind deutlich anhand der roten Verfärbung zu erkennen. Sie repräsentieren die Osteoklasten, die sich aufgrund der vermehrten Aktivität von TRAP exprimieren und daher angefärbt werden können. Es lässt sich eindeutig ein vermehrter Nachweis von TRAP in den Gruppen b)-d) erkennen. Auch Gruppe e) zeigt im Vergleich zum Leerdefekt ein vermehrtes TRAP Vorkommen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Die meiste Osteoklastenaktivität lässt sich am Rand des Biomaterials CPC (M) nachweisen. In Umgebung des CPC bildet sich des weiteren Knochenmark (Km) in dem seinerseits ebenfalls Osteoklasten nachweisbar sind. Eine beginnende Knochenneubildung (KN) lässt sich deutlich erkennen.

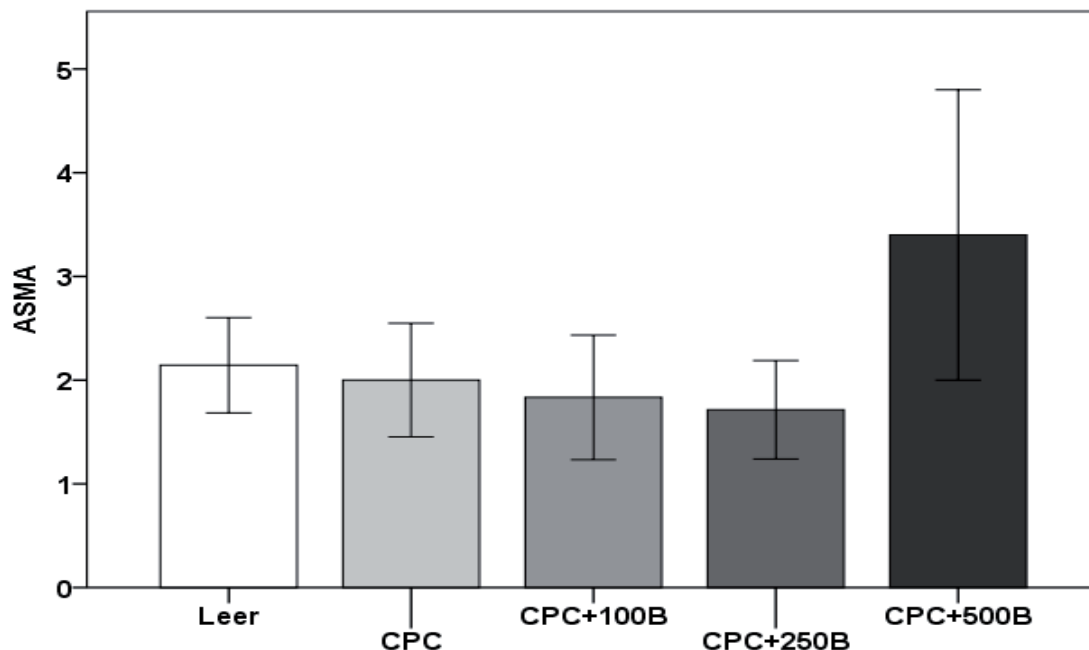


**Abbildung 17:** Dargestellt ist die Nachweisbarkeit von TRAP in den verschiedenen Gruppen. Die einzelnen angefärbten Makrophagen wurden unter dem Elektronenmikroskop ausgezählt. Abgebildet sind die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median der einzelnen Schnitte in den Gruppen. Im Leerdefekt zeigt sich eine signifikant geringere Nachweisbarkeit von TRAP im Vergleich mit den Gruppen in denen CPC sowie CPC mit 100 µg Bortezomib und CPC mit 250 µg Bortezomib angewendet wurde. Keine Signifikanz konnte im direkten Vergleich mit der Gruppe mit 500 µg Bortezomib, sowie im direkten Vergleich der Gruppen b-e miteinander erzielt werden.



### 3.3 Histomorphometrie ASMA

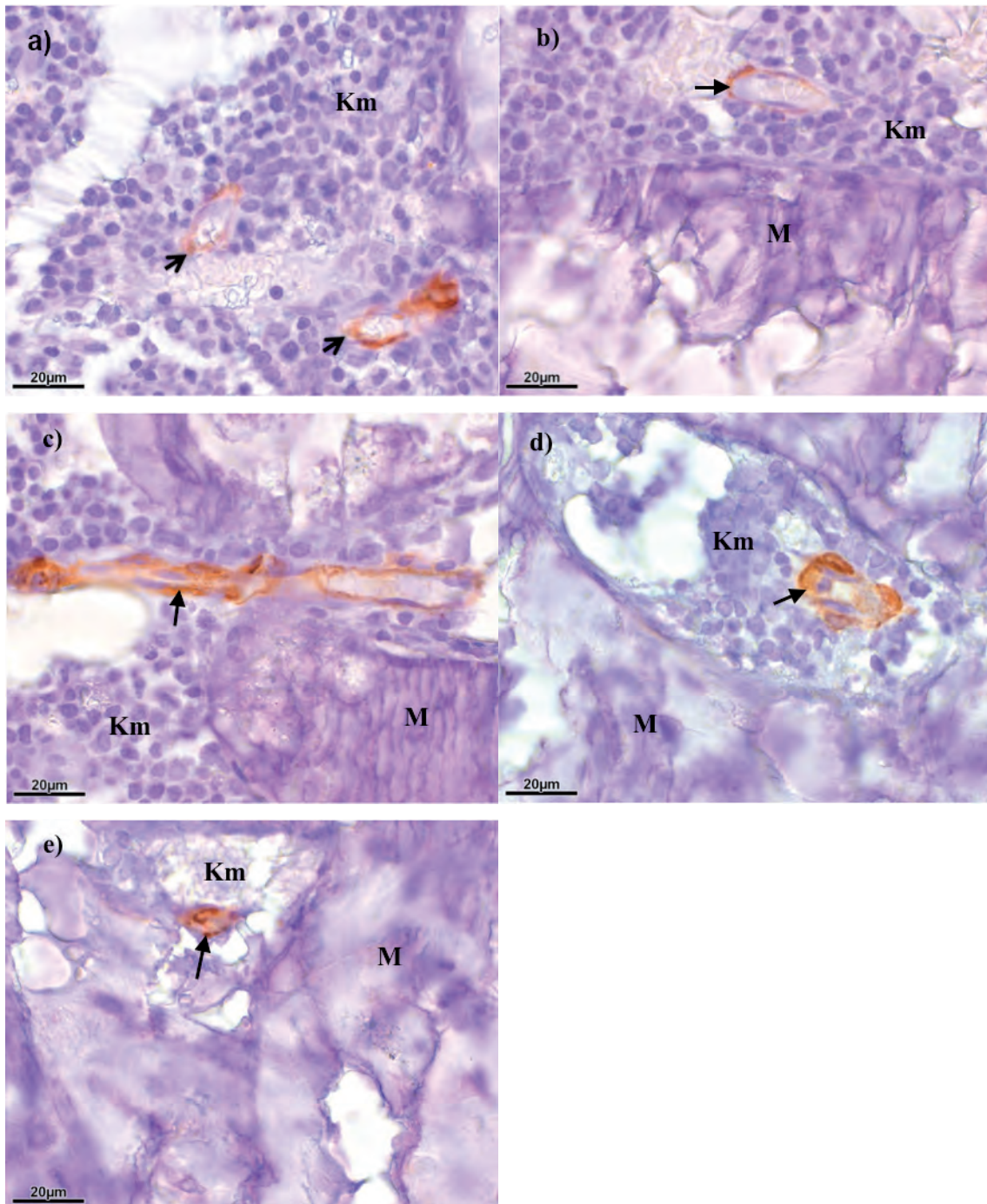
In den ASMA Färbungen konnten einzelne Gefäßanschnitte im Präparat dargestellt werden. Es gelang in den statistischen Auswertungen mittels Games-Howell Test nicht, im Vergleich vom Leerdefekt zu den Bortezomibkonzentrationen einen signifikanten Unterschied festzustellen. Es scheint eine leicht vermehrte Gefäßproliferation in der, mit 500µg Bortezomib behandelten Gruppe zu geben, im Vergleich zu allen anderen Gruppen, den Leerdefekt miteinbezogen. Dies erreichte jedoch keine statistische Relevanz.



**Abbildung 18:** Grafische Darstellung der ausgezählten Gefäßanschnitte in den einzelnen Untersuchungsgruppen. Abgebildet sind die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median in den einzelnen Gruppen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Dennoch zeigt sich ein vermehrtes Auftreten von Gefäßneubildungen in der Gruppe die mit CPC und 500 µg Bortezomib behandelt wurde.

Die Gefäßproliferation konnte vom optischen Eindruck der einzelnen Proben am ehesten im Randgebiet des Defektes festgestellt werden.

Die Gefäßanschnitte konnten durch die durchgeführte Färbung eindrücklich zur Darstellung gebracht werden in der 100-fachen Vergrößerung (Abbildung 19, siehe Pfeile).



**Abbildung 19 a)-e):** Immunhistochemischer Nachweis von ASMA im Bereich der Area of interest in 100facher Vergrößerung in den Gruppen a)-e). Es kann kein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Gruppen festgestellt werden. ASMA ließ sich in den randständigen Zellen der Gefäße anfärben. Die Vergrößerten Ausschnitte stammen aus der randständigen Zone um den gesetzten Defekt. Die Gefäßanschnitte wurden mittels Pfeil markiert. Das Biomaterial (CPC) wurde mit M beschriftet, das Knochenmark mit Km.

### 3.4 Histomorphometrie ED1

Bei der Untersuchung der Schnitte auf ED1 konnte ein eindruckliches Ergebnis erzielt werden. Bei dem Vergleich vom Leerdefekt mit den Bortezomibgruppen konnte eine signifikante Reduktion von ED1 in allen mit CPC und CPC + Bortezomib behandelten Femura festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

Im Detail zeigte sich im Vergleich von Leerdefekt und CPC eine geringere Exprimierung von ED1 in der CPC Gruppe mit einer Signifikanz von  $p = 0,004$ . Die ED1 Expression war im Leerdefekt im Vergleich zu der Gruppe die mit  $100\mu\text{g}$  Bortezomib behandelt wurde, mit einer Signifikanz von  $p = 0,0016$  deutlicher ausgeprägt.

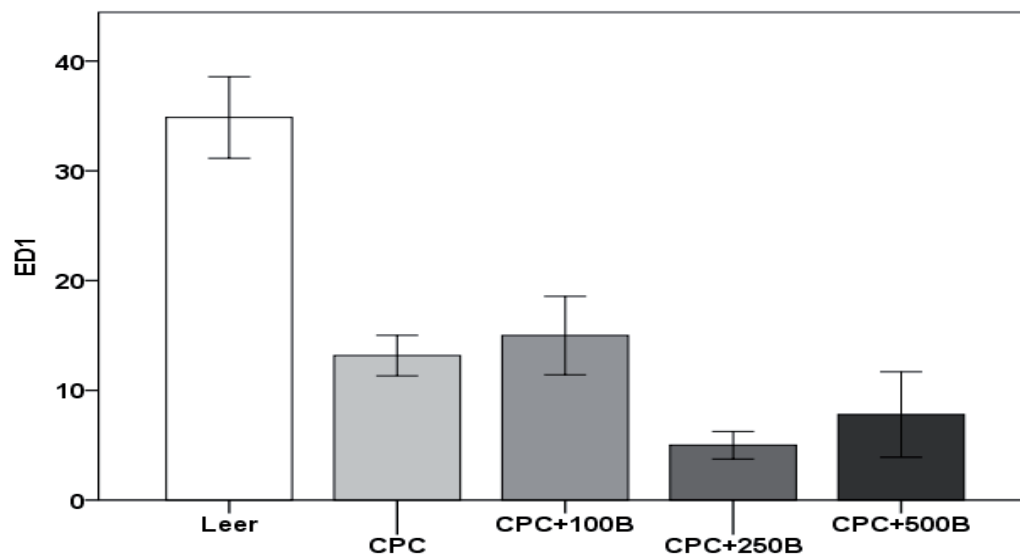
Der Vergleich mit der  $250\mu\text{g}$  Bortezomib-Gruppe zeigte mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,001$  eine höhere Ausprägung im Leerdefekt. Beim Vergleich mit der  $500\mu\text{g}$  Bortezomib Konzentration war  $p = 0,004$ , bei vermehrter Expression von ED1 im Leerdefekt.

Im Vergleich der Gruppen mit CPC sowie mit CPC und Bortezomib in den Konzentrationen  $100\mu\text{g}$ ,  $250\mu\text{g}$  und  $500\mu\text{g}$  konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In der Gruppe der Proben, die mit  $250\mu\text{g}$  Bortezomib behandelt wurden, kam es zu der geringsten Exprimierung von ED1 im Vergleich zu den anderen Gruppen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

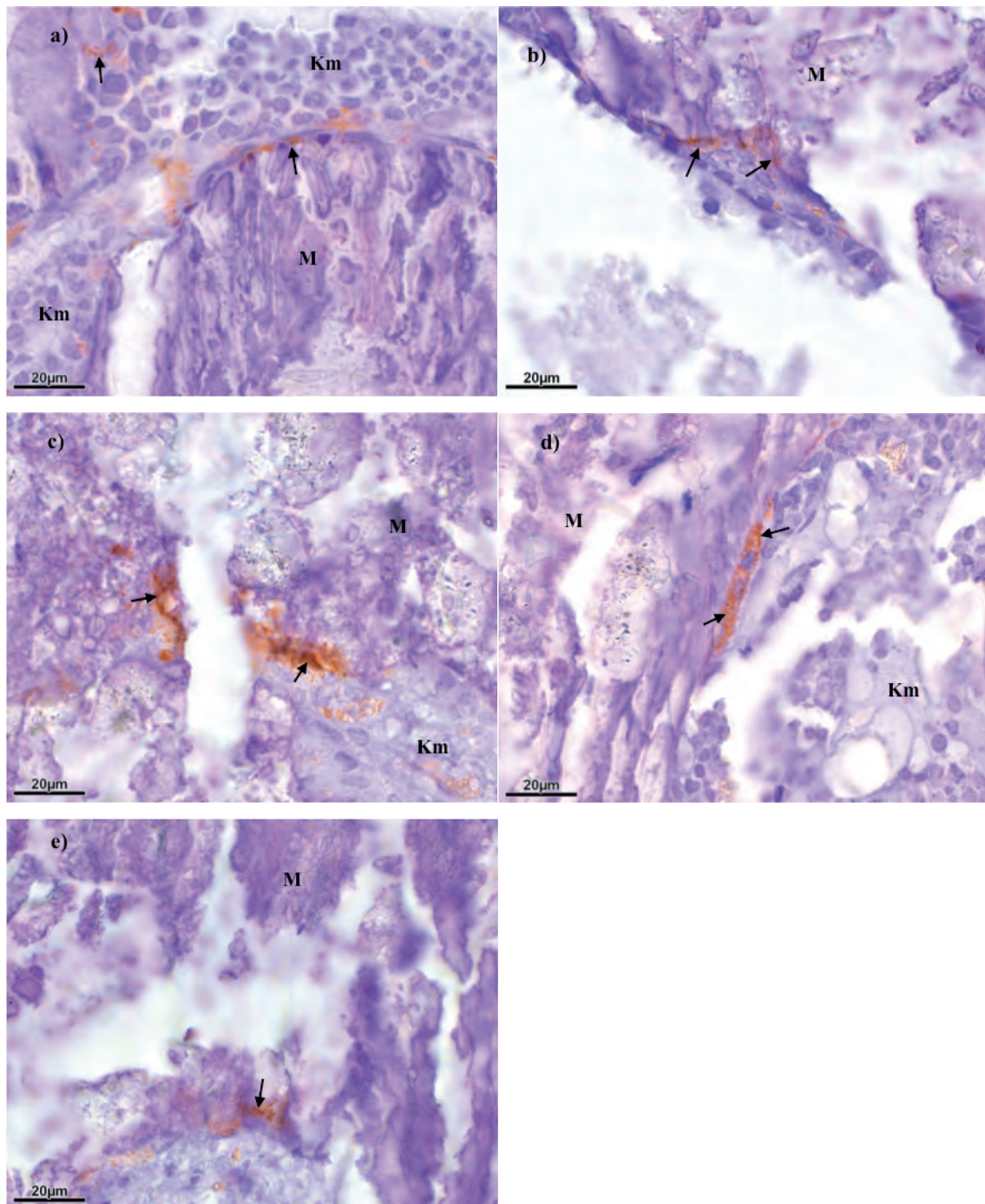
Die ED1 Antikörperfärbung ist für die Makrophagendarstellung spezifisch. Makrophagen wiederum sind ein Zeichen für Umbauprozesse, im Sinne einer Bildung von Granulationsgewebe oder Angiogenese.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung weisen ein vermehrtes Auftreten von Umbauprozessen im Leerdefekt, im Vergleich zu den CPC Gruppen, nach. Eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen in das CPC durch Zugabe von Bortezomib konnte nicht nachgewiesen werden.

Das angefärbte ED 1 wurde mittels Pfeilen markiert.



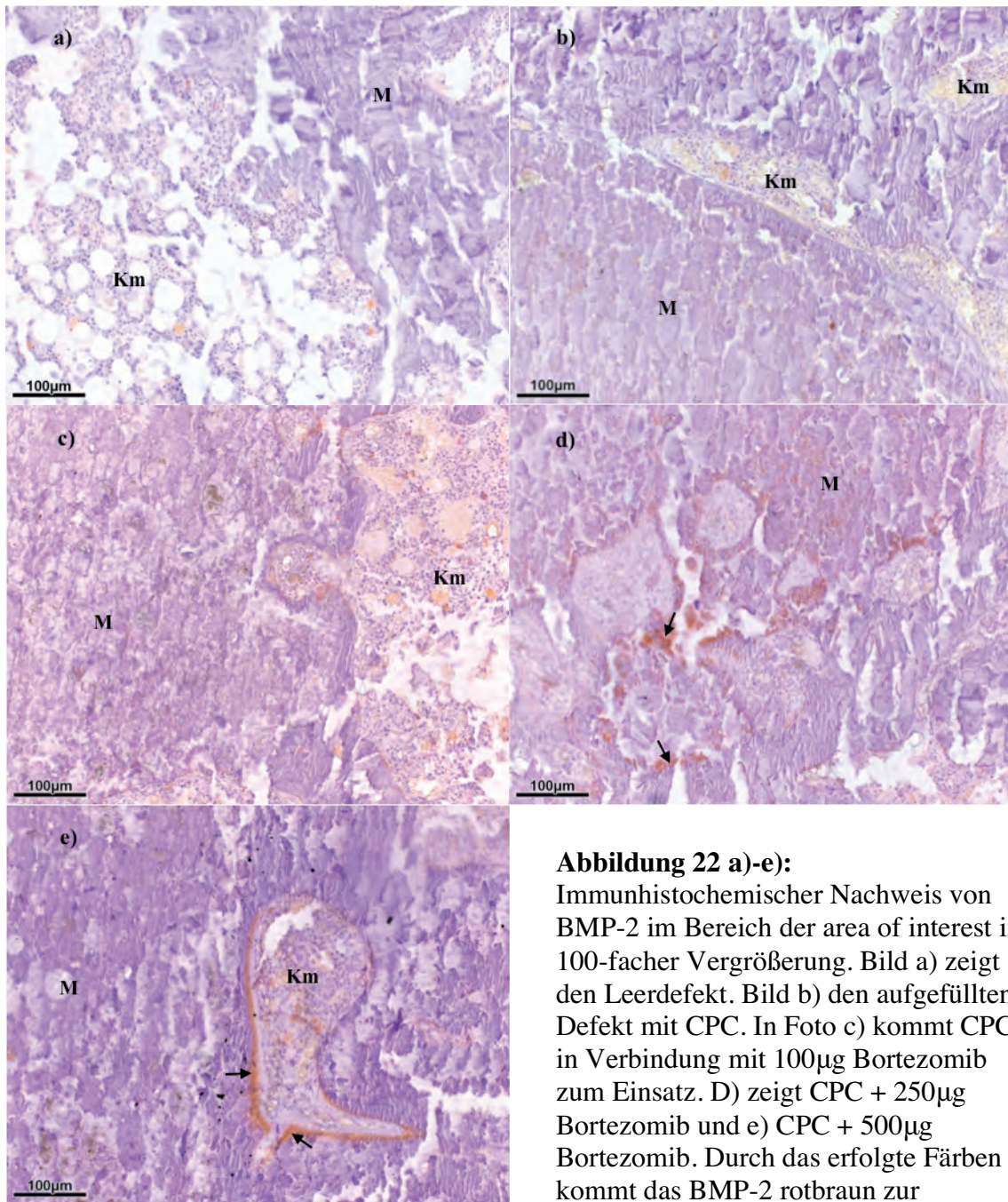
**Abbildung 20:** Elektronenmikroskopischer Nachweis von ED1 in den Gruppen Leerdefekt, CPC und CPC mit Bortezomib in den Konzentrationen 100  $\mu\text{g}$ , 250  $\mu\text{g}$  und 500  $\mu\text{g}$ . Abgebildet sind die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median in den einzelnen Gruppen. Es wird eine signifikant verminderte Expression von ED1 in den Gruppen mit CPC sowie CPC in Verbindung mit Bortezomib unterschiedlicher Konzentrationen im Vergleich zum Leerdefekt nachgewiesen. Die einzelnen CPC Gruppen weisen untereinander keinen signifikanten Unterschied auf.



**Abbildung 21 a)-e):** Immunhistochemischer Nachweis von ED-1 im Bereich der area of interest in 100-facher Vergrößerung in einem Maßstab von 20µm. Bild a) zeigt den Leerdefekt. Bild b) den aufgefüllten Defekt mit CPC. In Foto c) kommt CPC in Verbindung mit 100µg Bortezomib zum Einsatz. D) zeigt CPC + 250µg Bortezomib und e) CPC + 500µg Bortezomib. Das rötlich gefärbte und mit einem Pfeil → markierte, ED 1 wird vermehrt von Makrophagen produziert und zeigt eine vermehrte Makrophagenaktivität im Leerdefekt. Das Biomaterial CPC wurde mit M markiert. Umgebend zeigt sich erneut Knochenmark (Km).



### 3.5 BMP - 2



**Abbildung 22 a)-e):**

Immunhistochemischer Nachweis von BMP-2 im Bereich der area of interest in 100-facher Vergrößerung. Bild a) zeigt den Leerdefekt. Bild b) den aufgefüllten Defekt mit CPC. In Foto c) kommt CPC in Verbindung mit 100µg Bortezomib zum Einsatz. D) zeigt CPC + 250µg Bortezomib und e) CPC + 500µg Bortezomib. Durch das erfolgte Färben kommt das BMP-2 rotbraun zur Darstellung (→).

Ein signifikanter Nachweis von BMP konnte lediglich in den Präparaten mit 250µg (Abb. d) und 500µg (Abb. e) Bortezomib erzielt werden. Das BMP-2 konnte bei vermehrter Osteoblastenreaktion vermehrt in der Umgebung des CPCs (M) nachgewiesen werden. Das neu gebildete Knochenmark (Km) zeigt ein vermehrtes Auftreten von Osteoblasten besonders in den Gruppen mit 250 und 500 µg Bortezomib.

Nach der durchgeführten Färbung des BMP-2 konnte im Leerdefekt kein entsprechender Nachweis von BMP-2 erbracht werden.

Auch in den Präparaten, die mit CPC aufgefüllt wurden, sowie in den Femura, deren Defekt mit CPC und 100µg Bortezomib aufgefüllt wurde, konnte kein vermehrter Nachweis von BMP-2 erbracht werden.

Einen signifikanten Anstieg des mittels Färbung sichtbar gemachten BMP-2 konnten wir in den Gruppen, deren CPC mit 250µg bzw. 500µg Bortezomib versetzt waren, nachweisen. Dies deutet auf eine vermehrte Osteoblastenproliferation und eine Hochregulierung von Runx2/Cbfa1 hin.

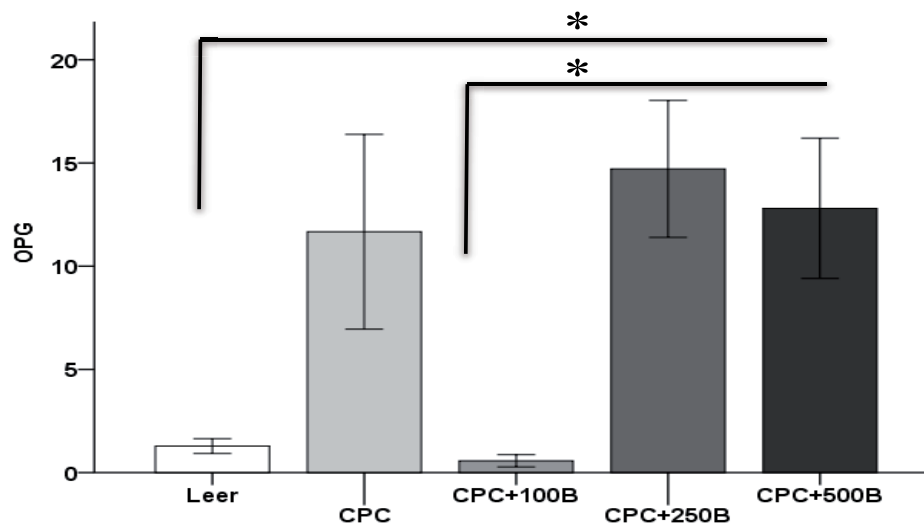
Ein signifikanter Unterschied in der Expression von BMP-2 zwischen den Präparaten mit 250µg und denen mit 500µg Bortezomib konnte nicht festgestellt werden.

Der Nachweis von BMP-2 wurde in der Area of Interest untersucht. Dabei handelt es sich um ein festgelegtes Areal, das den Defekt und das umgebende Gewebe beinhaltet.

Die nachgewiesenen Reaktionen konnten mit 100facher Vergrößerung in den oben abgebildeten elektronenmikroskopischen Bildern zur Darstellung gebracht werden (Abbildung 22). Das angefärbte BMP-2 wurde mittels Pfeil markiert. BMP-2 konnte am intensivsten in den das Material umgebenden Arealen nachgewiesen werden.

### **3.6 Histomorphometrie OPG**

Durch den Games-Howell Test konnte eine signifikant geringere Nachweisbarkeit von OPG im Leerdefekt im Vergleich zu der Gruppe mit CPC sowie 250µg Bortezomib in Kombination CPC aufgezeigt werden ( $p=0,036$ ). Den geringsten Nachweis von OPG konnten wir im Leerdefekt, sowie in der Gruppe, in der CPC mit 100µg Bortezomib versetzt wurde, erzielen. Sowohl in der CPC Gruppe, als auch in den Bortezomib-Konzentrationen von 250µg und 500µg, konnte eine deutlich höhere Menge an OPG nachgewiesen werden. Zwischen den Konzentrationen 250µg und 500µg konnte jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Auch im Vergleich zu der CPC Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Signifikant stellte sich lediglich der direkte Vergleich der Gruppe mit CPC in Kombination mit 100µg Bortezomib, mit der Gruppe Proben, die mit 250µg Bortezomib behandelt wurden, dar ( $p=0,029$ ).

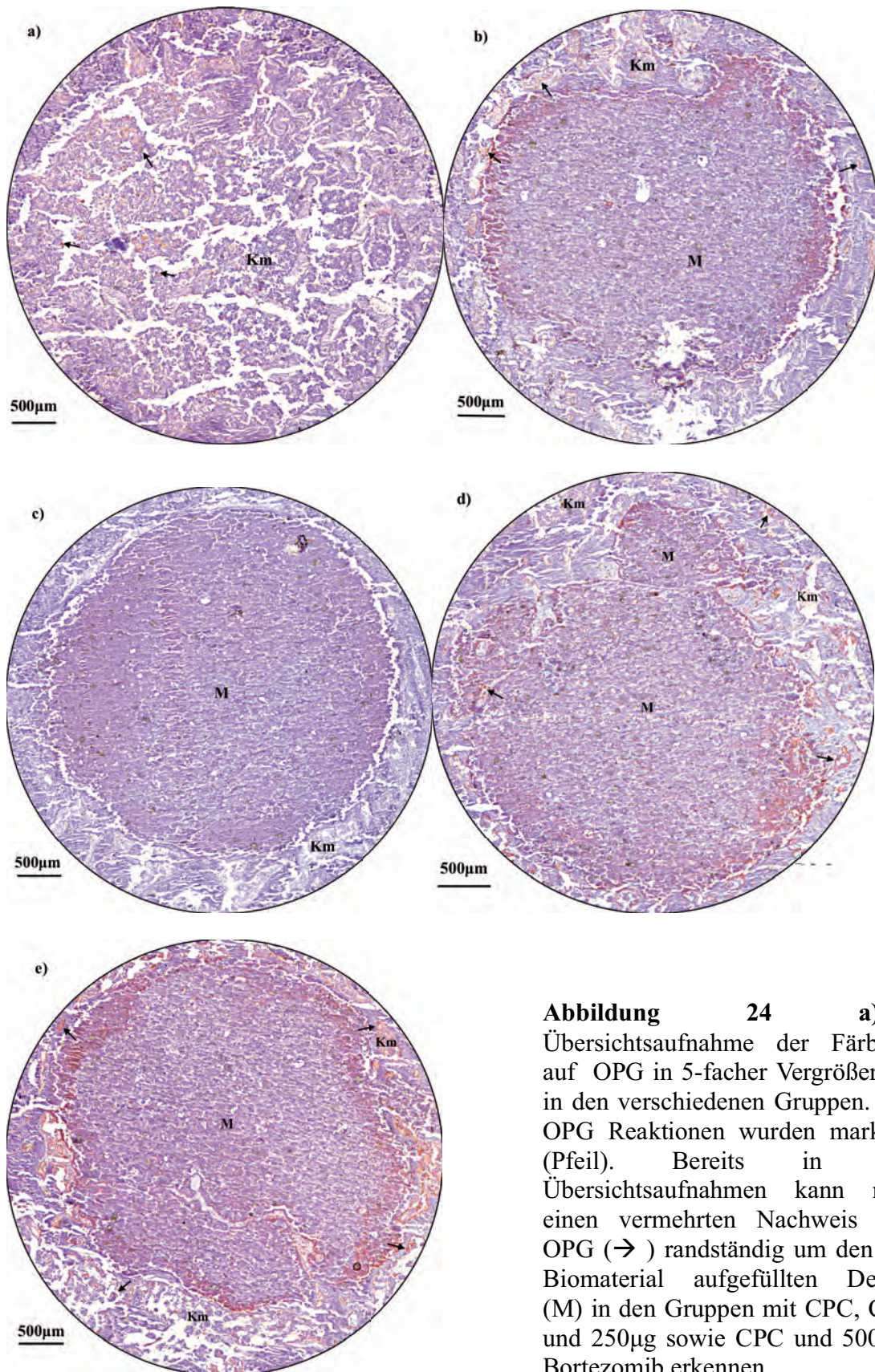


**Abbildung 23:** Abgebildet sind die im Elektronenmikroskop durch Färbung sichtbar gemachten Nachweise von OPG als Zeichen einer vermehrten Osteoblastenaktivität. Dargestellt sind die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median. Die Sternchen zeigen eine Signifikanz von (\*)  $p < 0,05$  an. Es konnte ein signifikanter geringerer Nachweis von OPG Leerdefekt-Gruppe sowie der Gruppe mit 100 $\mu$ g Bortezomib im Vergleich zu der Gruppe mit 250 $\mu$ g Bortezomib nachgewiesen werden.

OPG wird, wie auch RANKL, von Osteoblasten exprimiert. Es bindet an RANKL und verhindert so die Interaktion zwischen RANKL und seinem Rezeptor RANK. Dadurch wird die sonst von der RANKL/Rank-Verbindung initiierte Osteoklastenproliferation unterbunden.

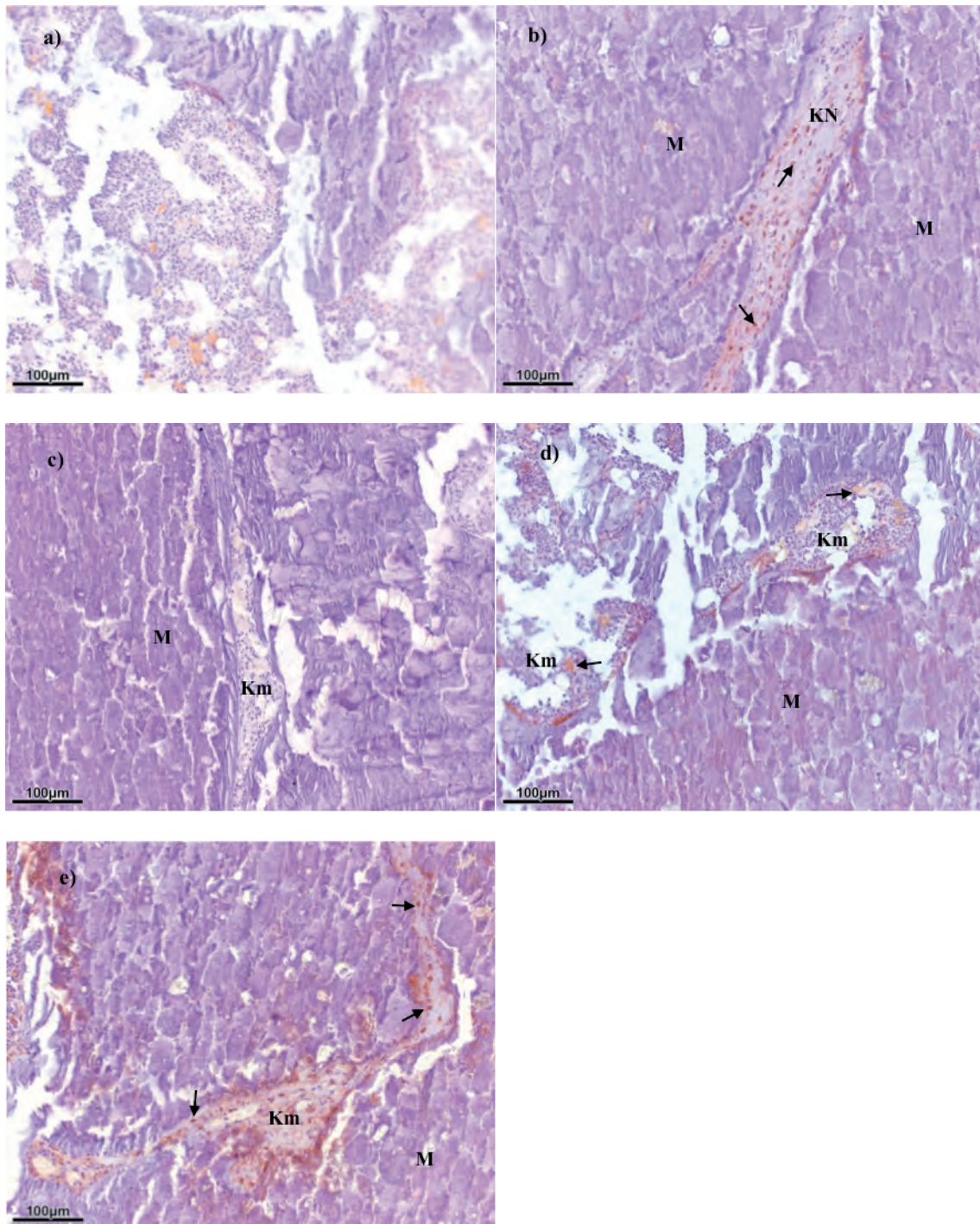
Somit konnte ein positiver Effekt von Bortezomib in Konzentrationen von 250 $\mu$ g und 500 $\mu$ g Bortezomib auf die Osteogenese nachgewiesen werden, sowie eine Suppression von Osteolysen. Signifikant war dieser jedoch nur für eine Konzentration von 250 $\mu$ g Bortezomib.





**Abbildung 24 a)-e):** Übersichtsaufnahme der Färbung auf OPG in 5-facher Vergrößerung in den verschiedenen Gruppen. Die OPG Reaktionen wurden markiert (Pfeil). Bereits in den Übersichtsaufnahmen kann man einen vermehrten Nachweis von OPG ( $\rightarrow$ ) randständig um den mit Biomaterial aufgefüllten Defekt (M) in den Gruppen mit CPC, CPC und 250µg sowie CPC und 500 µg Bortezomib erkennen.





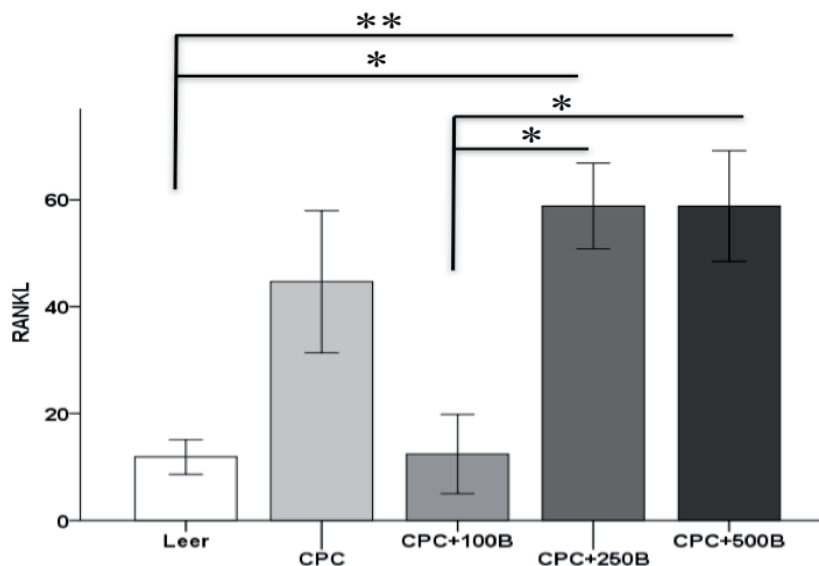
**Abbildung 25 a)-e):** Immunhistochemischer Nachweis von OPG im Bereich der Area of interest in 100x Vergrößerung. Dies zeigt deutlicher den verminderten Nachweis von OPG im Leerdefekt sowie in der Gruppe mit CPC und 100µg Bortezomib. Die Angefärbten OPG Areale wurde mit Pfeilen (→) markiert. Sie liegen im randständigen Bereich des CPC (M). Die Umgebung hat sich mit Knochenmark (Km) aufgefüllt. Eine vermehrte Knochenneubildung (KN) konnte nachgewiesen werden.

### 3.7 Histomorphometrie RANKL

In der Untersuchung der Expression von RANKL konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse im Wesentlichen denen des OPG entsprechen. Da beide Proteine von Osteoblasten exprimiert werden, kann auf eine vermehrte Osteoblastenproliferation in den entsprechenden Gruppen geschlossen werden.

Eine signifikant geringere Expression von RANKL bestand im Leerdefekt im Vergleich zu der CPC Gruppe mit Bortezomib in den Konzentrationen 250µg ( $p=0,07$ ) und 500µg ( $p=0,04$ ).

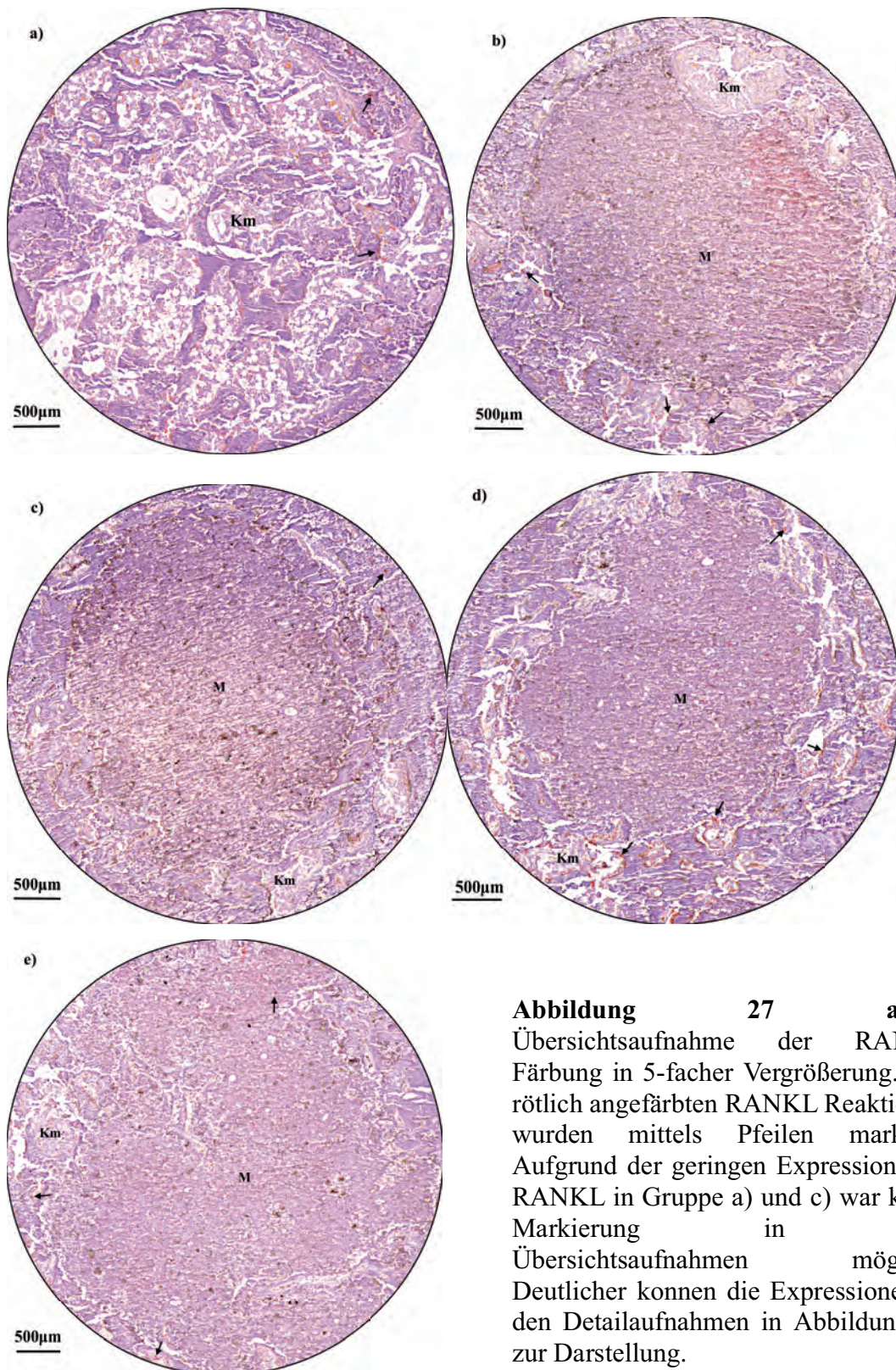
Auch in der Gruppe mit 100µg Bortezomib + CPC zeigte sich eine signifikant geringere Expression von RANKL als in den Gruppen mit 250µg ( $p=0,01$ ) und 500µg Bortezomib ( $p=0,04$ ). Zwischen den 250µg und 500µg Proben konnte entsprechend dem Ergebnis bei OPG auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 26:** Die Sternchen zeigen eine Signifikanz von (\*)  $p<0,05$ , (\*\*)  $p<0,01$  und (\*\*\*)  $p<0,001$  an. Abgebildet ist die Menge des mittels Färbung sichtbar gemachten RANKL in den Gruppen a)-e). Dargestellt sind die Minimal- und Maximalwerte sowie der Median. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit 250µg Bortezomib und zum einen der Leerdefekt-Gruppe sowie zum anderen der Gruppe mit 100µg Bortezomib nachgewiesen werden. Auch zwischen der Gruppe mit 500µg Bortezomib und dem Leerdefekt, sowie der Gruppe mit CPC+100µg Bortezomib bestand ein signifikanter Unterschied.

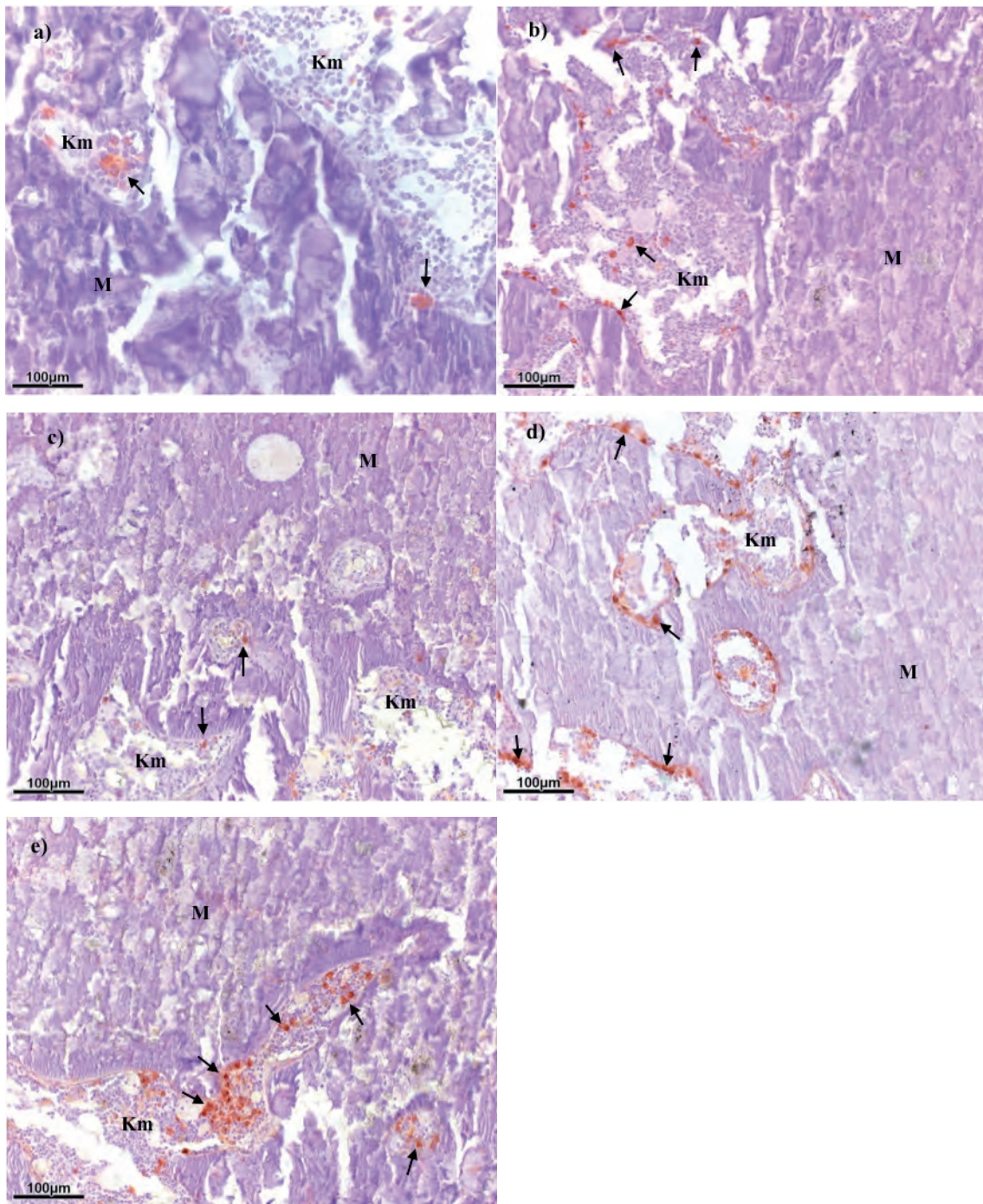
Eine Steigerung der Dosierung von Bortezomib von 250µg auf 500µg erscheint daher nicht sinnvoll, im Hinblick darauf eine vermehrte Osteoblastenproliferation erreichen zu wollen.





**Abbildung 27 a)-e):** Übersichtsaufnahme der RANKL Färbung in 5-facher Vergrößerung. Die rötlich angefärbten RANKL Reaktionen wurden mittels Pfeilen markiert. Aufgrund der geringen Expression von RANKL in Gruppe a) und c) war keine Markierung in den Übersichtsaufnahmen möglich. Deutlicher können die Expressionen in den Detailaufnahmen in Abbildung 28 zur Darstellung.





**Abbildung 28 a)-e):** Immunhistochemischer Nachweis von RANKL im Bereich der Area of interest in 100x Vergrößerung. Hier zeigt sich deutlich der vermehrte Nachweis von RANKL in den Schnitten mit b) CPC, d) CPC + 250µg Bortezomib und e) CPC + 500µg Bortezomib. Die angefärbten RANKL Areale wurde mit Pfeilen markiert. Auch hier lokalisiert sich die meiste Aktivität der Osteoblasten im Umgebungsareal um den ehemaligen Defekt (M). Die Osteoblasten zeigen sich in rötlicher Färbung im Knochenmark (Km) welches sich um den aufgefüllten Defekt gebildet hat.

## 4 Diskussion

Im Zuge der sich wandelnden Demografie und der stetig steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung hat die Erforschung von malignen und degenerativen osteolytischen Erkrankungen einen zunehmend höheren Stellenwert erlangt. Neben dem Mamma-, Bronchial-, Nieren-, Schilddrüsen- und dem Prostata-Karzinom sind auch das Multiple Myelom und andere maligne Erkrankungen durch das Auftreten von osteolytischen Knochenmetastasen charakterisiert.

Mit dem Ziel, zunächst die enzymatischen Prozesse zu erforschen, die zu den Osteolysen und somit zu einer Vielzahl an pathologischen Frakturen führen, mit denen wir im klinischen Alltag konfrontiert werden, wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt. Im Folgenden wurden vermehrt Studien mit dem Ziel der Modifikation und Verbesserung der aktuellen Therapieoptionen durchgeführt. Eines der vielversprechenden Medikamente, die bei der Behandlung des Multiplen Myeloms zum Einsatz kommen ist das Bortezomib. Mit der von uns durchgeführten Untersuchung hoffen wir einen Beitrag leisten zu können, um die Behandlung der pathologischen Frakturen, sowie der Osteolysen, die bedingt sind durch ein Multiples Myelom, zu optimieren und somit die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern. In den bisher durchgeführten Studien wurde ein Fokus auf die systemische Gabe von Bortezomib gelegt. Da die Wirksamkeit des Medikaments nachgewiesen werden konnte hat es mittlerweile auch eine Zulassung für die systemische Applikation in der klinischen Anwendung erhalten.

In unserer Untersuchung konnte nun das Bortezomib am Tiermodell in verschiedenen Konzentrationen direkt in einen knöchernen Defekt implantiert werden. Das Bortezomib wurde in verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit CPC untersucht und in Vergleich gesetzt zu einem Leerdefekt und reiner Auffüllung des Defektes mit CPC. Der Erfolg der Behandlung lässt sich anhand von verschiedenen Markern beurteilen, die als Indikatoren für die Osteoklasten- und Osteoblasten-Aktivität dienen. Vielfach wurde die Expressierung von ALP als Marker für die Osteoblastenaktivität bzw. die Osteoblastogenese untersucht.

Terpos et al. haben bereits 2006 beschrieben, dass ein signifikanter Anstieg von ALP bei Patienten, die nach einem Rezidiv eines Multiplen Myeloms mit Bortezomib behandelt wurden, auftrat. Der Studienaufbau von Terpos gab vor, dass den Versuchstieren an den Tagen

1, 4, 8 und 11 eines 3 Wochen dauernden Zyklus Bortezomib in einer Konzentration von 1,3 mg/m<sup>2</sup> verabreicht wurde. Die Arbeitsgruppe um Terpos führte jeweils 4 der genannten Zyklen durch, bei Respondern schlossen sich erneute 4 Zyklen im Anschluss an. Bereits nach 4 Zyklen konnten Terpos et al. einen signifikanten Anstieg von ALP, der nach 8 Zyklen noch verstärkt werden konnte, nachweisen. Im Rahmen der Studie wurden lediglich Messungen von ALP vor Behandlungsbeginn und nach 4 und 8 Zyklen durchgeführt. Eine Messung nach einmaliger Gabe fand nicht statt (Terpos et al., 2006).

Lund und Mitarbeiter beschrieben analog zu den Ergebnissen von Terpos und Mitarbeitern, bei vergleichbarem Versuchsaufbau einen signifikanten Anstieg von ALP. Den maximalen Anstieg von ALP beobachteten Lund und Mitarbeiter nach 48 Tagen. Bei Nonrespondern zeigte sich kein ALP Anstieg. Bei der Arbeitsgruppe um Lund wurden jedoch zusätzlich Patienten ausgeschlossen, die bereits mit Bisphosphonaten vorbehandelt worden waren (Lund et al., 2010). In einer weiteren Studie beschrieb Zangari 2005 einen signifikant größeren Anstieg von ALP nach Behandlung mit Bortezomib im direkten Vergleich mit einer Dexamethasonbehandlung (Zangari et al., 2005).

Durch Munemasa und Mitarbeiter wurde im Jahre 2008 in einer dosisabhängigen Untersuchung beschrieben dass die Gabe von 0,5nM Bortezomib zu einem Anstieg von ALP führte. Die weitere Steigerung der Dosierung auf 1nM, 2,5nM, oder 5nM führte jedoch zu keinem weiteren Anstieg von ALP. Es konnte sogar eine signifikant verminderte Expression von ALP bei weiterer Dosissteigerung nachgewiesen werden. Bei der von Munemasa und Mitarbeitern durchgeführten Untersuchung handelte es sich im Gegensatz zu den Arbeiten von Lund, Zangari und Terpos und Mitarbeitern um eine in vitro Studie an mesenchymalen Stammzellen (Munemasa et al., 2008; Zangari et al., 2005; Lund et al., 2010; Terpos et al., 2006). De Matteo und Mitarbeiter beschrieben im Gegensatz zu den Studien von Terpos, Lund und Zangari, gegensätzliche Ergebnisse. Sie untersuchten Knochenbiopsien aus dem Os Ilium von Patienten mit Multiplem Myelom, die mit Bortezomib behandelt wurden, und konnten dabei keine signifikanten Abweichungen des ALP Levels im direkten Vergleich von Patienten mit Multiplem Myelom und gesunden Patienten nachweisen, jeweils mit und ohne Behandlung mit Bortezomib. Auch bei De Matteo und Mitarbeitern wurden verschiedene Konzentrationen von Bortezomib getestet, jedoch auch im Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (De Matteo et al., 2010; Zangari et al., 2005; Lund et al., 2010; Terpos et al., 2006).

Die Ergebnisse von DeMatteo entsprachen den von uns erzielten Nachweisen. In der von uns

durchgeführten Untersuchung konnten wir ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ALP zwischen den Proben mit CPC plus Bortezomib in verschiedenen Konzentrationen und den Proben mit reinem CPC oder dem Leerdefekt feststellen. Dies könnte möglicherweise auf eine mangelnde Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch BMP-2 hindeuten, da der Wnt-Signalweg verantwortlich ist für die Expression von ALP. Ebenfalls zu untersuchen wäre, ob möglicherweise eine Behandlungsdauer von 30 Tagen bei lokaler Applikation nicht ausreichend war, um eine entsprechende Osteoblastenneubildung mit ALP-Expression zu erzielen. Da es jedoch auch in unserer Studie durch die Behandlung mit Bortezomib durchaus zu einer vermehrten Expression von BMP-2 kam, ist davon auszugehen, dass es dennoch zu einer vermehrten Osteoblastenbildung kam. Es bleibt zudem zu vermuten, dass eine bisher unbekannte Störung in der Interaktion von BMP-2 vorliegt, die eine ALP Expression unterbindet. Denkbar wäre auch, dass entsprechend der Studie von Munemasa und Kollegen gegebenenfalls schon eine Konzentration von 100µg Bortezomib eine Supprimierung von ALP hervorruft (Munemasa et al., 2008). Gegen diese These spricht allerdings das gute Ansprechen anderer Osteoblastenmarker auf die Bortezomibbehandlung.

DeMatteo und Mitarbeiter beschrieben im Rahmen ihrer Untersuchung weiterhin einen vermehrten Nachweis von BMP-2, nach Behandlung der Osteoblasten mit Bortezomib, ohne dass sich daran eine vermehrte Expression von ALP anschloss (De Matteo et al., 2010). Dies legt ebenfalls eine mangelnde Aktivierung des Wnt-Signalwegs nahe. Eine vermehrte Expression von BMP2 nach Behandlung mit Bortezomib wurde bereits von diversen Studien beschrieben. Auch in unserer Untersuchung konnten wir einen deutlichen Anstieg von BMP2 ab einer Konzentration von 250µg Bortezomib nachweisen. Auch bei 500 µg Bortezomib konnten wir eine ebenso ausgeprägte Expression von BMP2 feststellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Proteinase-Inhibitoren, wie Bortezomib, durch eine Stimulation von BMP2 eine Knochenneubildung anregen (Garrett et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Garrett fand in einer an Mäusen durchgeführten Studie heraus, dass es zu einem Anstieg von BMP-2 nach Behandlung der Mäuse mit Proteasomeninhibitoren kommt. In einer differenzierteren Beobachtung konnten Garrett und Mitarbeiter zudem nachweisen, dass sich der stimulierende Effekt der Proteasomeninhibitoren nur auf BMP-2, jedoch nicht auf BMP-4 oder BMP-6, auswirkt (Garrett et al., 2003). Auch Oyajobi und Mitarbeiter beschrieben im Jahre 2007 in ihrer Studie an Mauskalotten analog zu den von uns erzielten Ergebnissen, einen dosisabhängigen Anstieg von BMP-2 (Oyajobi et al., 2007). Ähnliches beschrieben auch Gao und Mitarbeiter, die einen vermehrten Nachweis von BMP-2 bei Kulturen gesunder Testpersonen sowie Multiplen Myelom-Patienten nach Behandlung mit Bortezomib, im



Vergleich zu nicht mit Bortezomib behandelten Kulturen erbrachten (Gao et al., 2014). BMP-2 seinerseits fördert die Osteoblastendifferenzierung durch Phosphorylierung von Smad-Proteinen, die wiederum den Transkriptionsfaktor Runx2/Cbaf1 aktivieren (Qiang et al., 2012).

Als aussagekräftige Marker für die Osteoklastenaktivität wurde vielfach, analog zu der vorliegenden Arbeit, die Expressierung von RANKL und OPG untersucht. Beide werden von Osteoblasten gebildet und üben einen starken Einfluss auf die Osteoklastenaktivität aus. OPG hemmt diese durch Bindung an RANKL. RANKL stimuliert die Osteoklasten durch Bindung an seinen Rezeptor RANK, der auf der Oberfläche der Osteoklasten exprimiert ist. Nach Bindung des RANKL durch OPG ist eine Stimulierung der Osteoklastogenese durch Bindung an RANK nicht mehr möglich. OPG ist ein natürlich vorkommendes Protein, das den Mitgliedern der TNF Rezeptorfamilie ähnelt. RANKL ist einer der Mitglieder der TNF Liganden-Familie. Das Verhältnis von RANKL zu OPG spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von ossären Beteiligungen beim Multiplen Myelom. Die Arbeitsgruppe um Terpos beschrieb 2003 für das Verhältnis RANKL/OPG eine entscheidende prognostische Rolle in der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Multiplem Myelom (Terpos et al., 2003). Die Arbeitsgruppe von Simonet fand analog dazu heraus, dass die Verabreichung von OPG in vivo die Osteoklastenaktivität und die damit einhergehende Knochenresorption hemmt und die Anzahl an ausgereiften Osteoklasten senkt (Simonet et al., 1997). Terpos und Mitarbeiter fanden in seiner bereits zuvor beschriebenen Studie eine Reduktion von RANKL durch die Therapie mit Bortezomib (Terpos et al., 2006). Auch in den Untersuchungen von Hongming und Jian sowie Breitzkreutz und Mitarbeitern wurde die Reduktion von RANKL, nach Behandlung mit Bortezomib, beschrieben. Dies zeigt eine Verringerung der resorptiven Eigenschaften der Osteoklasten an, sowie eine reduzierte Osteoklasten-Differenzierung (Metzler et al., 2007). Bei der Arbeit von Breitzkreutz und Mitarbeitern handelte es sich um eine in vitro Studie, bei der Blut von Multiplen Myelom Patienten entnommen wurde und mit 2 oder 5 nM Bortezomib oder mit Lenalidomide behandelt wurde (Breitzkreutz et al., 2008). Das Studienkonzept von Hongming entsprach dem von Breitzkreutz. Die entnommenen Zellen wurden mit 2.5 und 5 nM Bortezomib behandelt (Hongming und Jian, 2009). Die Arbeitsgruppe um Bao untersuchte vierzig Patienten, mit therapierefraktärem Multiplem Myelom oder mit einem Rezidiv, die mittels Bortezomib behandelt wurden. Die Behandlungen fanden zwischen Dezember 2006 und September 2008 statt. Im Rahmen der Behandlung wurden vor Therapiebeginn sowie drei Monate nach Therapieabschluss die Konzentrationen von DKK-1, sRANKL, OPG und TRACP-5b gemessen. Es konnte ein

signifikanter Rückgang von RANKL nach Behandlung mit Bortezomib nachgewiesen werden (Bao et al., 2011). In einer Tierstudie am Mausmodell von Polzer und Mitarbeitern wurde den Tieren intravenös zwei mal wöchentlich 0,75mg/kg Bortezomib injiziert. Dabei konnten sie einen Rückgang von RANKL beobachten, sowie einen Anstieg der nachgewiesenen Konzentration an OPG (Polzer et al., 2011).

In der von uns durchgeführten Untersuchung machten wir von den beschriebenen Wirkungen abweichende Beobachtungen. Wir konnten in der Leerdefektgruppe, sowie in der Gruppe, deren Defekt mit CPC + 100µg Bortezomib aufgefüllt wurde, einen signifikant geringeren Nachweis von RANKL im Vergleich mit den anderen Proben aufzeigen. In den Präparaten der Gruppen, deren Defekt mit CPC, sowie mit CPC und Bortezomib in den Konzentrationen 250 und 500µg aufgefüllt wurde, konnten wir einen signifikant höheren Nachweis von RANKL erbringen. Dies verdeutlicht, dass an unserem Mausmodell, bei lokaler Anwendung von Bortezomib am Knochen, keine verminderte Expression von RANKL erzielt werden konnte. In der von uns durchgeführten Untersuchung des OPG konnten wir eine mit diesem Ergebnis korrespondierende Beobachtung aufzeigen. Auch in der quantitativen Bestimmung von OPG kam es in unserer Untersuchung zu einem erhöhten Nachweis von OPG in den Gruppen 2, 4 und 5. Dies entspricht erneut CPC, versetzt mit Bortezomibkonzentrationen von 250 und 500µg sowie dem reinen CPC. Signifikanz erreichte dieser Nachweis jedoch nur in der Gruppe von CPC mit 250µg Bortezomib. Im direkten Vergleich konnten wir in der 250µg-Gruppe einen signifikant vermehrten Nachweis von OPG als im Leerdefekt und der 100µg-Gruppe nachweisen. So konnten wir zeigen, dass stets ein konstantes Verhältnis zwischen RANKL und seinem Antagonisten besteht, unabhängig von dem Einsatz von Bortezomib und dessen Konzentration. Wie vielfach beschrieben, kommt es bei Patient mit multiplem Myelom zu einer Minderexpression von OPG und einer vermehrten Expression von RANKL (Terpos et al., 2014a, Terpos et al., 2014b). In der von Terpos im Jahre 2006 durchgeführten Studie konnte durch die Behandlung mit Bortezomib ein signifikanter verminderter Nachweis von RANKL sowohl nach 4 als auch nach 8 Zyklen beschrieben werden, jedoch keine signifikante Veränderung in der Nachweisbarkeit von OPG zu irgendeinem Behandlungszeitpunkt. Das RANKL/OPG Verhältnis wurde dementsprechend, entgegen den von uns erzielten Ergebnissen, sowohl nach 4 als auch nach 8 Zyklen signifikant durch die Behandlung mit Bortezomib gesenkt (Terpos et al., 2006). Terpos konnte weiterhin zeigen, dass OPG in Multiplen Myelom Patienten um etwa 36% geringer ist als in einer Kontrollgruppe mit gesunden Probanden. Das OPG Level war gegenläufig zu der Anzahl an Osteolysen und der TRAP Konzentration (Terpos et al., 2003).

Ein weiteres entscheidendes Enzym, das zum Nachweis von Osteoklasten dient, ist die TRAP (Tatrat resistente saure Phosphatase). Sie wird von Osteoklasten gebildet und wird ebenso wie RANKL und OPG häufig als Indikator für die Osteoklastenaktivität bestimmt. Die Arbeitsgruppe um Terpos beschrieb beispielsweise nach Behandlung mit Bortezomib eine Reduktion von TRAP, als Zeichen einer verminderten Osteoklastenaktivität (Terpos et al., 2006). Entsprechende Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen von Hongming und Jian sowie Boissy und Mitarbeitern (Boissy et al., 2008; Hongming und Jian, 2009). Auch in der bereits in Zusammenhang mit RANKL beschriebenen Studie von Bao und Mitarbeitern konnte ein signifikant vermindertes Vorkommen von TRAP nach Behandlung mit Bortezomib nachgewiesen werden (Bao et al., 2011). Hongming und Jian konnten insbesondere zeigen, dass das verminderte Auftreten von TRAP in der von ihnen durchgeführten Untersuchung dosisabhängig war. Bei einer Dosierung von 0,5 und 1nM konnte keine TRAP Inhibierung nachgewiesen werden. Erst ab einer Dosierung von 2,5 und 5nM Bortezomib wurde eine signifikante Reduktion von TRAP beschrieben (Hongming und Jian, 2009).

Mukherjee und Mitarbeiter erzielten in ihren Untersuchungen davon abweichende Ergebnisse. In ihrer tierexperimentellen Studie fand sich nach Gabe von Bortezomib keine signifikante Reduktion der TRAP Aktivität. Auch bei Mukherjee wurde die Untersuchung an Mäusen in vivo durchgeführt. Dies führte möglicherweise zu einer Limitierung in der Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Den weiblichen, 7 Wochen alten C57BL/6 Mäusen wurde 0, 0.05, 0.125, oder 0.3 mg/kg Bortezomib drei mal wöchentlich injiziert. Das Alter der Tiere könnte einen relevanten Einfluss auf die Reaktion auf Bortezomib gehabt haben. Des weiteren war in der Studie keine klare Identifikation der Stammzellen möglich und somit keine klare Einschätzung der Ergebnisse zu erzielen, im Vergleich zu den in vitro Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen, die in anderen Studien durchgeführt wurden (Mukherjee et al., 2008). In der von uns durchgeführten Untersuchung zeigte sich wiederum ein von den zuvor beschriebenen Studien abweichendes Ergebnis. In der TRAP Färbung unserer Proben konnte im Leerdefekt nur eine signifikant geringe TRAP Aktivität nachgewiesen werden im Vergleich zu den Proben mit CPC alleine, sowie den Proben, die mit CPC und 100µg und 250µg Bortezomib versetzt wurden.

Die Nachweisbarkeit von TRAP stieg bereits in der CPC Gruppe deutlich an und erreichte bei der Gruppe mit 100µg Bortezomib und CPC seine maximale Expression. Bei Konzentrationen von 250 und 500µg kam es mit zunehmender Konzentration zu einer verminderten Nachweisbarkeit von TRAP. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine Suppression der Osteoklastenaktivität in der Therapie mit Bortezomib dosierungsabhängig ist. Diese

Schlussfolgerung korrespondiert auch mit unseren Ergebnisse für OPG und RANKL. Es würde zudem in Einklang stehen mit den Ergebnissen, die Hongming und Jian in ihrer Untersuchung erzielen konnten. Auch dort konnte eine Konzentrationsabhängigkeit für den Nachweis von TRAP festgestellt werden.

Ein weiterer Aspekt bei der Proliferation von malignen Erkrankungen ist die Angiogenese. Sie ist ein zentraler Regulator des Tumorwachstums. Die Vaskularisierung ist verantwortlich für die Sauerstoffversorgung und Ernährung der Tumorzelle. Diese Beobachtung der „Antiangiogenese“ als Therapieansatz wurde bereits 1971 von Judah Folkman beobachtet.

Er stellte fest, dass solide Tumoren, sobald sie von ihrer Blutversorgung abgeschnitten sind, unfähig sind zu weiterem Größenwachstum (Folkman, 1971; Li et al., 2008).

Maligne Zellen im Knochenmark bringen das Zusammenspiel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus dem Gleichgewicht und stimulieren, durch die Interaktion und Bildung von entsprechenden Faktoren, die Angiogenese. Sie führen so, durch Imitation der physiologischen Angiogenese, zu einer erhöhten Vaskularisierung (Li et al., 2008). Die Dichte der Mikrogefäße als stellvertretendes Maß für den Grad an Angiogenese im Knochenmark ist bei Patienten mit Multiplem Myelom, im Vergleich zu einer nicht erkrankten Kontrollgruppe, erhöht. Dies steht in Korrelation zu einer erhöhten Krankheitsproliferation und einer verminderten Überlebensrate (White et al., 2013). Als ursächlich dafür ist die erhöhte Dichte an Mikrogefäßen anzusehen, welche durch den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen, sowie den Abtransport von Kataboliten, ein vermehrtes Tumorwachstum anregen. Die Endothelzellen sezernieren zudem Wachstumsfaktoren für die Tumorzellen und produzieren eine Vielzahl von Proteinasen, die wiederum die Tumordinvasion fördern. Eine vermehrte Vaskularisierung mit Vergrößerung der endothelialen Oberfläche gibt dem Tumor zudem eine verbesserte Möglichkeit in die Blutzirkulation einzudringen und zu metastasieren (Roccaro et al., 2006). Bortezomib seinerseits ist ein Antagonist des antiapoptotischen NF- $\kappa$ B Signalwegs, der zur Apoptose von endothelialen Zellen führt und zur Reduktion der Produktion von VEGF und IL-6 (Shin et al., 2008; Williams et al., 2003). Beim Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) handelt es sich um ein wichtiges Signalmolekül, das sowohl in der Vaskulogenese als auch in der Angiogenese seine Wirkung entfaltet. VEGF stimuliert hauptsächlich das vaskuläre Endothel (Ylä-Herttuala et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Roccaro konnte in ihren Untersuchungen zeigen, dass bei Patienten mit Multiplem Myelom die Behandlung mit Bortezomib zu einer Inhibierung der Angiogenese führt. Es greift als potenter und selektiver

Proteaseninhibitor die Angiogenese des Multiplen Myeloms direkt an den MMECs (multiple myeloma patient-derived endothelial cells) an. Damit inhibiert es die Proliferation, die Chemotaxis, die Adhäsion an Fibronectin sowie die Bildung von Kapillaren. Es reguliert für die Angiogenese relevante Faktoren herunter, wie das VEGF, IL-6, IGF-1, Ang1 und Ang2. Diese Hemmung der Angiogenese ist dosisabhängig und zeitabhängig. Die Untersuchung wurde in vitro an HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) durchgeführt (Roccaro et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bortezomib die Produktion von Zytokinen im Knochenmark hemmt und dadurch die Entwicklung von tumorassoziierten Blutgefäßen limitiert. Auch die Arbeitsgruppe um Williams sowie Shin und Mitarbeiter konnten entsprechendes in ihren Studien zeigen. Bei beiden Studien handelt es sich um in vitro Studien anhand von Zellreihen (Shin et al., 2008; Williams et al., 2003). Es wird vermutet, dass der antiangiogenetische Effekt von Bortezomib durch eine Hemmung der Expression von NF- $\kappa$ B abhängigen proangiogenetischen Zytokinen vermittelt wird (Sunwoo et al., 2001). Zudem wird Bortezomib eine hemmende Wirkung auf die angiogenetische und vaskulogene Aktivität von Knochenmarksmakrophagen zugesprochen, durch Hemmung der Zellproliferation, Adhäsion, Migration und Expression von angiogenetischen Zytokinen (Moschetta et al., 2010). Die Angiogenese wurde in der von uns durchgeführten Studie anhand der ASMA Färbung untersucht, die einzelne Gefäßanschnitte zur Darstellung bringt. In unseren Untersuchungen konnten wir jedoch keinen hemmenden Effekt von Bortezomib auf die Angiogenese nachweisen. Es kam zu keinem verminderten Auftreten von Gefäßanschnitten nach Behandlung mit Bortezomib im Vergleich zum Leerdefekt oder dem reinen CPC.

Bei ED1 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der die meisten Makrophagenpopulationen erkennt, sowie Monozyten im peripheren Blut und Vorläuferzellen im Knochenmark (Damoiseaux et al., 1994). Asimakopoulou und Mitarbeiter haben zeigen können, dass Makrophagen das Wachstum, das Überleben und die Medikamentenresistenz von Multiplen Myelomzellen über Zell-Zell-Kontakt und andere Signalwege unterstützt (Asimakopoulou et al., 2013). Nach Aktivierung von Multiplen Myelom Plasmazellen und mesenchymalen Stromazellen, können Makrophagen Wachstumsfaktoren, proteolytische Enzyme, Cytokine und inflammatorische Mediatoren, die das Plasmazellwachstum und die Überlebensrate fördern, freisetzen. Makrophagen stimulieren das Tumorstadium über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Angiogenese, Wachstum und die Förderung von Medikamentenresistenzen. Sie sind essentiell für die Induktion von Angiogenese und Vaskulogenese. Es konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen eine

entscheidende Rolle für das Überleben von Multiplen Myelom Patienten einnehmen (Berardi et al., 2013).

Bortezomib hat einen Einfluss auf die Makrophagenproliferation, -adhäsion und -migration beim Multiplen Myelom. Die Behandlung von Knochenmarks-Makrophagen mit Bortezomib hemmt sowohl die Vaskulogenese als auch die Angiogenese. Es konnte ebenso in Studien bereits nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit Bortezomib zu einem Rückgang der Proliferationsrate der Makrophagen führt (Kim et al., 2012; Ribatti et al., 2013).

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass im direkten Vergleich mit dem Leerdefekt, durch die Behandlung mit CPC und CPC in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Bortezomib, die Anzahl der nachweisbaren Makrophagen anhand der ED-1 Färbung deutlich gesenkt werden konnte. Ohne statistische Signifikanz zu erreichen konnte der geringste Nachweis von Makrophagen in der Gruppe, die mit 250µg Bortezomib in Kombination mit CPC behandelt wurden, erbracht werden.

Dies deutet darauf hin, dass die Behandlung mit Bortezomib auch in der lokalen Anwendung, den bereits in anderen Studien beschriebenen hemmenden Einfluss auf die Makrophagen ausübt. Die besten Ergebnisse konnten in einer Konzentration von 250µg Bortezomib erreicht werden.

Die Zusammenschau aller unserer Ergebnisse lässt Rückschlüsse darauf zu, dass bei lokaler Anwendung von Bortezomib, in Kombination mit CPC als Trägersubstanz, durchaus eine Hemmung der Osteoklastogenese und eine Stimulation der Osteoblastogenese erreicht werden können. Die Knochenneubildung scheint durch die lokale Applikation angeregt zu werden. Die ausgeprägteste Stimulation von Osteoblastogenese und Hemmung der Osteoklastogenese konnte bei einer Konzentration von 250µg Bortezomib in Kombination mit CPC erreicht werden. Auch wenn nicht alle Ergebnisse statistische Signifikanz erreichten, so können doch Rückschlüsse darauf zugelassen werden, dass es bei einer Konzentration von 250µg zu der deutlichsten Hemmung der Gefäßneubildung kam, im Vergleich zu dem untersuchten Leerdefekt. Auch die Inhibierung von Makrophagen war in der Dosierung von 250µg am stärksten ausgeprägt ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Eine Supprimierung der Makrophagen war jedoch in allen Dosierungen signifikant nachweisbar. Ebenso konnte in dieser Dosierung die höchste Expression von OPG als Zeichen der Osteoblastenaktivität nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in unseren Untersuchungen eine vermehrte Nachweisbarkeit von BMP-2 nach lokaler Behandlung des knöchernen

Defektes mit 250µg und 500µg Bortezomib in Kombination CPC erbracht werden. Der Nachweis von TRAP als Osteoklastenmarker konnte ebenfalls mit zunehmender Konzentration von Bortezomib am Knochen reduziert werden. Ein, den Studien in vitro entsprechendes Ergebnis für RANKL, im Sinne einer Supprimierung bei Behandlung mit Bortezomib, konnte bei lokaler Anwendung nicht erzielt werden. Ebenso konnte kein gesteigerter Nachweis von ALP als direkter Nachweis von gesteigerter Osteoblastenaktivität in unserer Studie erbracht werden. Dies könnte, wie bereits zuvor beschrieben, auf eine mangelnde Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch BMP-2 hindeuten, da der Wnt-Signalweg verantwortlich ist für die Expression von ALP. Es handelt sich bei unserer Untersuchung bisher um die einzige Studie, die eine lokale Anwendung von Bortezomib im Knochen untersucht. Anhand der bei uns erzielten Ergebnisse lässt sich eine Empfehlung zur lokalen Anwendung Bortezomib bei einer Konzentration von 250µg in Kombination mit CPC aussprechen. Es sollten noch weitere klinische Tests durchgeführt werden, da man nicht von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse am Tiermodell auf den Menschen ausgehen kann.

Die lokale Anwendung sollte jedoch, nach unseren Ergebnissen, lediglich ergänzend zu der systemischen Therapie eingesetzt werden, da im Vergleich zu den Ergebnissen von Studien, die eine systemische Gabe von Bortezomib untersuchten, die Ergebnisse nach lokaler Applikation einige Defizite aufweisen. So konnte in unserer Studie, nach Bortezomibgabe, entgegen den Ergebnissen nach systemischer Applikation, keine vermehrte Expression von ALP beobachtet werden. Auch die Angiogenese konnte nicht in dem Ausmaß gehemmt werden, wie es nach systemischer Gabe beobachtet werden konnte. Weiterhin konnte auch das RANKL/OPG Verhältnis nicht in vergleichbarem Ausmaß gesenkt werden wie in den Studien von beispielsweise den Arbeitsgruppen um Terpos und Zangari. Des Weiteren wäre eine Vergleichsstudie, die die lokale Anwendung und systemische Anwendung von Bortezomib in vivo vergleicht mit einer Kombination aus beidem, empfehlenswert, um festzustellen, ob die zusätzliche Applikation lokal im Knochendefekt einen zusätzlichen Therapieerfolg erbringt.

Dass der Drei-Phasenverbundwerkstoff CPC als Medium zur Defektauffüllung geeignet ist, konnte die vorliegende wissenschaftliche Arbeit nachweisen. Die osteokonduktiven und integrationsstimulierenden Effekte der einzelnen Komponenten konnten sich regelrecht entfalten. Kein Implantat löste sich aus dem Defekt und es kam zu keinem Aufbrechen des CPC in seiner Gesamtheit.

Auch eine entsprechende Wirkstofffreisetzung von Bortezomib hat, aufgrund der durchaus positiven Ergebnisse, stattgefunden.

Es bleibt jedoch dennoch in weiteren Studien zu prüfen, ob gegebenenfalls durch eine Modifikation der Zusammensetzung des CPC, eine verbesserte Freisetzung von Bortezomib und somit eine Optimierung des Therapieerfolges erreicht werden kann. Des weiteren sollte ein direkter Vergleich der Therapieergebnisse nach lokaler Anwendung von Bortezomib in Kombination mit CPC, mit den Ergebnissen nach Behandlung des lokalen Defektes mittels Bortezomib in Kombination mit anderen Biomaterialien, wie beispielsweise einem Xerogel, erfolgen.

Zudem wären weitere Studien sinnvoll, die den Effekt von unterschiedlichen Medikamentenkombinationen auf die Knochenneubildung bei lokaler Anwendung an einem knöchernen Defekt beim Multiplen Myelom untersuchen.

Bei systemischer Anwendung und im Rahmen von in vitro Studien wurden beispielsweise bereits Kombinationen aus Bortezomib und Dexamethason, Bortezomib in Kombination mit Dexamethason und Zoledronsäure, Bortezomib in Verbindung mit Dexamethason und Lenalidomide sowie ähnliche Kombinationen getestet, mit zum Teil positiven Ergebnissen. Ähnliche Medikamentenkombinationen ließen sich gegebenenfalls auch bei lokaler Anwendung untersuchen um eine Optimierung des Therapieerfolges zu erzielen.



## 5 Zusammenfassung

Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit der Behandlung von osteolytischen Knochendefekten beim Multiplen Myelom befassen.

Im Rahmen dieser Studien konnte Bortezomib, als Osteoblasten stimulierendes und Osteoklasten hemmendes Medikament, positive Ergebnisse in der systemischen Anwendung erzielen, sowohl in Monotherapie, als auch in Kombinationstherapien mit anderen Medikamenten. Im Rahmen unserer Studie wurde die lokale Anwendung von Bortezomib und deren Therapieerfolg untersucht.

In einer in vivo Studie am Rattenfemur wurde Bortezomib in verschiedenen Konzentrationen mit dem Drei-Phasenverbundwerkstoff CPC in einen iatrogen gesetzten Knochendefekt am distalen Femur appliziert. In immunhistochemischen und histomorphometrischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es zu einer entsprechenden Supprimierung von Markophagen kommt. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurde ein vermehrter Nachweis von OPG und BMP 2 nach Therapie erbracht, was auf eine vermehrte Osteoblastenaktivität und eine Suppression der Osteoklastogenese hinweist. Eine Inhibierung der Expression von RANKL konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Auch das Verhältnis RANKL/OPG, als entscheidender Indikator für einen erhöhten Metabolismus der Osteoklasten und den Grad der Knochendestruktion, konnte durch die lokale Applikation von Bortezomib nicht gesenkt werden, unabhängig von der Konzentration. Auch ein reduzierter Nachweis von TRAP nach Behandlung mit höheren Bortezomibkonzentrationen, deutet auf eine Hemmung der Osteoklastenaktivität hin.

Die Gefäßproliferation konnte bei lokaler Anwendung nicht gehemmt werden. Auch ein Nachweis von ALP als Marker für vermehrte Osteoblastenproliferation wurde nicht festgestellt.

In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass bei lokaler Anwendung von Bortezomib, die besten Ergebnisse in Hinblick auf Osteoblastenstimulation und Osteoklastenhemmung, bei einer Konzentration von 250µg erzielt werden.

Eine Steigerung der Konzentration auf 500µg erbrachte keinen zusätzlichen positiven Effekt. CPC hat sich als Biomaterial zur Freisetzung von Bortezomib bewährt.

## 6 Summary

Several studies have already been published, concentrating on the treatment of osteolytic bone lesions in patients suffering from Multiple Myeloma.

Within the context of these studies Bortezomib, was able to achieve a positive impact in systemic application as monotherapy as well as in combination with other agents, by stimulation of osteoblasts on the one hand an inhibition of osteoclasts on the other hand. Within our study the local application of Bortezomib and its therapeutic success is being analysed.

In an in vivo study on femura of rats Bortezomib was applied in different concentration in combination with the biomaterial CPC into an iatrogenic bone lesion of the distal femur. In immunohistochemical and histomorphometric examinations it could be demonstrated, that the treatment causes a suppression of macrophages. In the present scientific work an increased occurrence of OPG und BMP 2 has been proven, which indicates an increased activity of the osteoblasts as well as a suppression of osteoclastogenesis.

An inhibition in the expression of the RANKL was not been shown in this study. The RANKL/OPG ratio, which is also an important indicator of increased metabolism of osteoclasts and on the degree of bone destruction, could not be reduced by local application of Bortezomib, regardless of the dosage. A reduced expression of TRAP after treatment with Bortezomib indicates an inhibition of osteoclast-activity.

The proliferation of vessels could not be suppressed by local application in this study. Furthermore an increased expression of ALP as proof for an increased osteoblastproliferation could not be accieved.

In this study we were able to prove, that Bortezomib in local application achieved best results in a concentration of 250 µg. Increasing the dosage to 500 µg did not show any additional positive effects.

CPC as a biomaterial showed to be of good use and releases bortezomib continuously in an effective dosage.

## 7 Abkürzungen

ALP	alkalische Phosphatase
ANG	Angiopoetin
BAFF	B-cell activating factor
BMM	Bone Marrow Macrophages
BMP	bone morphogenetic protein
BMSC	bone marrow stromal cells
Cbfa1	core binding factor alpha 1
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CCP	cytochrome c peroxidase
c-Fms	macrophage colony-stimulating factor receptor
CFU-Fs	fibroblast colony-forming units
CFU-Obs	osteoblast colony-forming units
CHRD	Chordin
CREST	Clinical Response and Efficiency Study of bortezomib in the Treatment of relapsing multiple Myeloma
DKK-1	Dickkopf-1
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FGF	fibroblast growth factor
HSC	Hämatopoetischen Stammzellen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IGF	insulin-like growth factor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I $\kappa$ B	inhibitor of NF- $\kappa$ B
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MEA	2-Methoxyethylacetat
MIP	Macrophage inflammatory protein
MM	Multiples Myelom
MMA	Methylmethacrylat
MMECS	multiple myeloma patient– derived endothelial cells

MSCs	mesenchymale Stammzellen
NF-kB	nuclear factor kB
OCN	Ostocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
ORR	overall response rate
PTHr	Parathormonrezeptor
RANK	receptor activation of NF-kB
RANKL	RANK-Ligand
Rhoa	Ras homolog gene family, member A
Runx2	Runt-related transcription factor 2
sFRP	soluble frizzles-related proteins
SUMMIT	multi-center, Phase II trial
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing Ligand
TRAP	Tartrate resistente alkalische Phosphatase
TWSG	Twisted gastrulation
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung: Pathophysiologie des Multiplen Myeloms und die möglichen Angriffstellen von Bortezomib.
- Abbildung 2:** Tabelle: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon.
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung: Lokale Kommunikationsmechanismen zur Knochenneubildung.
- Abbildung 4 a,b:** Schematische Darstellung: Entwicklung der Osteoblasten (A) und Osteoklasten (B).
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung: Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf den Knochenmetabolismus.
- Abbildung 6:** Schematische Darstellung: Interaktion zwischen OPG und RANKL
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung: Pathophysiologie des Multiplen Myeloms
- Abbildung 8 a,b:** Versuchsanordnung Narkosebox I
- Abbildung 9:** Versuchsanordnung Narkosebox II
- Abbildung 10 a,b:** Operationsschritt I
- Abbildung 11:** Operationsschritt II
- Abbildung 12 a-e:** Movat-Pentachrom-Färbung der Rattenfemura
- Abbildung 13 a-e:** Immunhistochemie ALP in 5-facher Vergrößerung Gruppe 1 bis 5
- Abbildung 14:** Grafische Darstellung: Nachweis von ALP in den Gruppen 1 bis 5
- Abbildung 15 a-e:** Immunhistochemie TRAP in 10-facher Vergrößerung
- Abbildung 16 a-e:** Immunhistochemie TRAP in 20-facher Vergrößerung
- Abbildung 17:** Grafische Darstellung: Nachweis von TRAP in den Gruppen 1-5
- Abbildung 18:** Grafische Darstellung: Nachweis von Gefäßanschnitten in der ASMA Färbung
- Abbildung 19 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von ASMA in 100-facher Vergrößerung
- Abbildung 20:** Grafische Darstellung: Nachweis von ED1 in den Gruppen 1-5
- Abbildung 21 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von ED1 in 100-facher Vergrößerung

- Abbildung 22 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von BMP-2 in 100-facher Vergrößerung
- Abbildung 23:** Grafische Darstellung: Nachweis von OPG in den Gruppen 1-5
- Abbildung 24 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von OPG in 5-facher Vergrößerung
- Abbildung 25 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von OPG in 100-facher Vergrößerung
- Abbildung 26:** Grafische Darstellung: Nachweis von RANKL in den Gruppen 1-5
- Abbildung 27 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von RANKL von in 5-facher Vergrößerung
- Abbildung 28 a-e:** Immunhistochemischer Nachweis von RANKL von in 100-facher Vergrößerung

## 9 Literaturverzeichnis

- Asimakopoulos, F., Kim, J., Denu, R. A., Hope, C., Jensen, J. L., Ollar, S. J., Hebron, E., Falangan, C., Callander, N., Hematti, P. (2013). Macrophages in multiple myeloma: emerging concepts and therapeutic implications. *Leukemia & Lymphoma*, 54(10), 2112–21.
- Bae, S. C., Lee, K. S., Zhang, Y. W., Ito, Y. (2001). Intimate relationship between TGF-beta/BMP signaling and runt domain transcription factor, PEBP2/CBF. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 83-A Suppl 1(Pt 1), S48–55.
- Bao, L., Lu, X.-J., Zhang, X.-H., Lai, Y.-Y., Zhu, H.-H., Lu, J., Huang, X.-J. (2011). Effect of different regimens on bone disease of multiple myeloma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi = Zhonghua Xueyexue Zazhi*, 32(4), 221–25.
- Barillé, S., Collette, M., Bataille, R., Amiot, M. (1995). Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin. *Blood*, 86(8), 3151–59.
- Barillé-Nion, S., Bataille, R. (2003). New insights in myeloma-induced osteolysis. *Leukemia & Lymphoma*, 44(9), 1463–67.
- Bataille, R., Chappard, D., Marcelli, C., Dessauw, P., Sany, J., Baldet, P., Alexandre, C. (1989). Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma: the importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 7(12), 1909–14.

- Bataille, R., Chappard, D., Marcelli, C., Rossi, J. F., Dessauw, P., Baldet, P., Sany, J., Alexandre, C. (1990). Osteoblast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone lesions. *British Journal of Haematology*, 76(4), 484–87.
- Bellido, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 94(1), 25–34.
- Berardi, S., Ria, R., Reale, A., De Luisi, A., Catacchio, I., Moschetta, M., Vacca, A. (2013). Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. *Journal of Oncology*, 183602.
- Berenson, J. R. (2005). Myeloma bone disease. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 18(4), 653–72.
- Berenson, J. R., Ma, H. M., Vescio, R. (2001). The role of nuclear factor-kappaB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Seminars in Oncology*, 28(6), 626–33.
- Boissy, P., Andersen, T. L., Lund, T., Kupisiewicz, K., Plesner, T., Delaissé, J. M. (2008). Pulse treatment with the proteasome inhibitor bortezomib inhibits osteoclast resorptive activity in clinically relevant conditions. *Leukemia Research*, 32(11), 1661–68.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337–42.
- Breitkreutz, I., Raab, M. S., Vallet, S., Hideshima, T., Raje, N., Mitsiades, C., Chauhan, D., Okawa, Y., Munshi, N. C., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2008). Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma. *Leukemia*, 22(10), 1925–32.



Broege, A., Pham, L., Jensen, E. D., Emery, A., Huang, T.-H., Stemig, M., Beppu, H., Petryk, A., O'Connor, M., Mansky, K., Gopalakrishnan, R. (2013). Bone morphogenetic proteins signal via SMAD and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways at distinct times during osteoclastogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 37230–40.

Cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide. Version 2.0. [Http://Www-Dep.iarc Fr](http://www-dep.iarc.fr).

Cao, Y., Zhou, Z., de Crombrughe, B., Nakashima, K., Guan, H., Duan, X., Jia, S-F, Kleinerman E. S. (2005). Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Research*, 65(4), 1124–28.

Capeller, B., Caffier, H., Sütterlin, M. W., Dietl, J. (2003). Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 5b as serum marker of bone metastases in human breast cancer. *Anticancer Research*, 23(2A), 1011–15.

Chamberlain, P., Compston, J., Cox, T. M., Hayman, A. R., Imrie, R. C., Reynolds, K., Holmes, S. D. (1995). Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase: development of a specific immunoassay of the isoenzyme in serum. *Clinical Chemistry*, 41(10), 1495–99.

Chen, J.-J., Zhang, N.-F., Mao, G.-X., He, X.-B., Zhan, Y.-C., Deng, H.-B., Song, D.-Q., Li, D.-D., Li, Z.-R., Si, S.-Y., Qiu, Q., Qang, Z. (2013). Salidroside stimulates osteoblast differentiation through BMP signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 62, 499–505.

- Damoiseaux, J. G., Döpp, E. A., Calame, W., Chao, D., MacPherson, G. G., Dijkstra, C. D. (1994). Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology*, 83(1), 140–47.
- Dietel, M., Suttrop, N., Zeitz, M., *Harrisons Innere Medizin*. 2012; Vol. 18. Berlin.
- De Matteo, M., Brunetti, A. E., Maiorano, E., Cafforio, P., Dammacco, F., Silvestris, F. (2010). Constitutive down-regulation of Osterix in osteoblasts from myeloma patients: in vitro effect of Bortezomib and Lenalidomide. *Leukemia Research*, 34(2), 243–49.
- de Mel, S., Lim, S. H., Tung, M. L., Chng, W.-J. (2014). Implications of Heterogeneity in Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, 2014, 232546.
- Dischereit, G., Lange, U. (2014). Osteoporosis - inflammatory effects on bone metabolism and fracture risk. *Zeitschrift Für Orthopädie Und Unfallchirurgie*, 152(2), 170–76.
- Driessens, F. C., Khairoun, I., Boltong, M. G., Planell, J. A. (1997). Design of calcium phosphate bone cement suitable for fixation of metal endoprotheses. *Bioceramics*, (1997), 279–81.
- Ehrlich, L. A., Chung, H. Y., Ghobrial, I., Choi, S. J., Morandi, F., Colla, S., Rizzoli, V., Roodman, G. D., Giuliani, N. (2005). IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood*, 106(4), 1407–14.
- Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 11(4), 219–27.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–86.

- Gao, Y., Jheon, A., Nourkeyhani, H., Kobayashi, H., Ganss, B. (2004). Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene*, 341, 101–10.
- Garrett, I. R., Chen, D., Gutierrez, G., Zhao, M., Escobedo, A., Rossini, G., Harris, S. e., Gallwitz, W., Kim, K. B., Crews, C. M., Mundy, G. R. (2003). Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(11), 1771–82.
- Giuliani, N., Rizzoli, V., Roodman, G. D. (2006). Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*, 108(13), 3992–96.
- Giuliani, N., Morandi, F., Tagliaferri, S., Lazzaretti, M., Bonomini, S., Crugnola, M., Mancini, C., Martella, E., Ferrari, L., Tabilio, A., Rizzoli, V. (2007). The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. *Blood*, 110(1), 334–38.
- Glass, D. A., Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., Taketo, M. M., Long, F., McMahon, A. P., Lang, R. A., Karsenty, G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell*, 8(5), 751–64.
- Greipp, P., San Miguel, J., Durie, B., Crowley, J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L., Kyle, R. A., Lahuerta, J. J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I., Westin, J. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23(15), 3412–3420.
- Hadjidakis, D. J., Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 385–396.

- Hamdy, N. A. T. (2007). Targeting the RANK/RANKL/OPG signaling pathway: a novel approach in the management of osteoporosis. *Current Opinion in Investigational Drugs* (London, England : 2000), 8(4), 299–303.
- Harousseau, J.-L., Moreau, P. (2009). Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 360(25), 2645–54.
- Hayman, A. R. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*, 41(3), 218–23.
- Heider, U., Fleissner, C., Zavrski, I., Kaiser, M., Hecht, M., Jakob, C., Sezer, O. (2006). Bone markers in multiple myeloma. *European Journal of Cancer* (Oxford, England : 1990), 42(11), 1544–53.
- Heinemann, S., Heinemann, C., Ehrlich, H., Meyer, M., Baltzer, H., Worch, H., Hanke, T. (2007). A novel biomimetic hybrid material made of silicified collagen: perspectives for bone replacement. *Advanced Engineering Materials*, 12, 1061-8.
- Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F., Karsdal, M. A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, 44(6), 1026–33.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J., Anderson, K. C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*, 61(7), 3071–76.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K. C. (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16639–47.

- Hongming, H., Jian, H. (2009). Bortezomib inhibits maturation and function of osteoclasts from PBMCs of patients with multiple myeloma by downregulating TRAF6. *Leukemia Research*, 33(1), 115–22.
- Hruska, K. A., Mathew, S., Saab, G. (2005). Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation Research*, 97(2), 105–14.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J., Thun, M. J. (2005). Cancer statistics, 2005. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 55(1), 10–30.
- Jules, J., Feng, X. (2014). In Vitro Investigation of the Roles of the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 in Murine Osteoclastogenesis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1155, 109–23.
- Kaiser, M. F., Heider, U., Mieth, M., Zang, C., Metzler, von, I., Sezer, O. (2013). The proteasome inhibitor bortezomib stimulates osteoblastic differentiation of human osteoblast precursors via upregulation of vitamin D receptor signalling. *European Journal of Haematology*, 90(4), 263–72.
- Kim, J., Denu, R. A., Dollar, B. A., Escalante, L. E., Kuether, J. P., Callander, N. S., Asimakopoulou, F., Hematti, P. (2012). Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *British Journal of Haematology*, 158(3), 336–46.
- Knothe Tate, M. L., Niederer, P., Knothe, U. (1998). In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone*, 22(2), 107–17.
- Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 658, 43–49.
- Kornak, U., Delling, G., Mundlos, S. (2003). Molecular Mechanisms of Regulation of Bone Density by Osteoclasts. *Deutsches Ärzteblatt*, Heft 19(9.Mai 2003), 1258–68.

- Kortüm, M., Einsele, H. (2011). Results of the first bortezomib-based induction therapie in the treatment of multiple Myeloma. *Expert Opin Pharmacother*, 2011 vol. 12 (10) pp. 1661-63
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., saito, S, Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J., Suda, S. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(9), 1345–1352.
- Krakauer, T. (2008). Nuclear factor-kappaB: fine-tuning a central integrator of diverse biologic stimuli. *International Reviews of Immunology*, 27(5), 286–92.
- LeBlanc, R., Catley, L. P., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Neuberg, D., Goloubeva, O., Pien, C. S., Adams, J., Gupta, D., Richardson, P. G., Munshi, N. C., Anderson, K. C. (2002). Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Research*, 62(17), 4996–5000.
- Lee, J. W., Chung, H. Y., Ehrlich, L. A., Jelinek, D. F., Callander, N. S., Roodman, G. D., Choi, S. J. (2004). IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood*, 103(6), 2308–15.
- Li, W. W., Hutnik, M., Gehr, G. (2008). Antiangiogenesis in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 143(5), 622–31.
- Liu, X.-H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Levine, A. C. (2006). Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, 225–33.

- Lund, T., Søre, K., Abildgaard, N., Garnero, P., Pedersen, P. T., Ormstrup, T., Dalaissé, M., Plesner, T. (2010). First-line treatment with bortezomib rapidly stimulates both osteoblast activity and bone matrix deposition in patients with multiple myeloma, and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *European Journal of Haematology*, 85(4), 290–99.
- Manolagas, S. C. (2014). Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas*.
- Melea, P. I., Melakopoulos, I., Kastiris, E., Tesseromatis, C., Margaritis, V., Dimopoulos, M. A., Terpos, E. (2014). Conservative treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients. *International Journal of Dentistry*, 427273.
- Melton, L. J., Crowson, C. S., O'Fallon, W. M. (1999). Fracture incidence in Olmsted County, Minnesota: comparison of urban with rural rates and changes in urban rates over time. *Osteoporosis International : a Journal Established as Result of Cooperation Between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 9(1), 29–37.
- Meran, J. G., Zojer, N., Ludwig, H. (1999). Klinik, Diagnose und Prognose des Multiplen Myeloms. *Onkologie*, 5, 297-306.
- Metzler, von, I., Krebbel, H., Hecht, M., Manz, R. A., Fleissner, C., Mieth, M., Kaiser, M., Jakob, C., Sterz, J., Kleeberg, L., Heuder, U., Sezer, O. (2007). Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia*, 21(9), 2025–2034.
- Mikhael, J. R., Dingli, D., Roy, V., Reeder, C. B., Buadi, F. K., Hayman, S. R., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Sher, T., Kyle, R. A., Lin, Y., Russell, S. J., Kumar, S., Bergsagel, P. L., Zeldenrust, S.R., Leung, N., Drake, M. T., Kapoor, P., Ansell, S. M., Witzig, T. E., Lust, J. A., Dalton, R. J., Gertz, M. A., Stewart, K., Rajkumar, S. V., Chanan-Khan, A., Lacy, M. Q. (2013). Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. Vol. 88, pp. 360–76.

- Mohty, M., Brissot, E., Savani, B. N., Gaugler, B. (2013). Effects of bortezomib on the immune system: a focus on immune regulation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 19(10), 1416–20.
- Moon, S.-J., Ahn, I. E., Jung, H., Yi, H., Kim, J., Kim, Y., Kwok, S.-K., Park, K.-S., Min, J.-K., Park, S.-H., Kin, H.-Y., Ju, J. H. (2013). Temporal differential effects of proinflammatory cytokines on osteoclastogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(4), 769–77.
- Moschetta, M., Di Pietro, G., Ria, R., Gnoni, A., Mangialardi, G., Guarini, A., Ditunno, P., Musto, P., D'Auria, F., Ricciardi, R., Dammacco, F., Ribatti, D., Vacca, A. (2010). Bortezomib and zoledronic acid on angiogenic and vasculogenic activities of bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *European Journal of Cancer*, 46(2), 420–29.
- Mukherjee, S., Raje, N., Schoonmaker, J. A., Liu, J. C., Hideshima, T., Wein, M. N., Jones, D. C., Vallet, S., Buxsein, M. L., Pozzi, S., Chhetri, S., Seo, Y. D., Aronson, J. P., Patel, C., Fulciniti, M., Purton, L. E., Glimcher, L. H., Lian, J. B., Stein, G., Anderson, K. C., Scadden, D. T. (2008). Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 491–504.
- Munemasa, S., Sakai, A., Kuroda, Y., Okikawa, Y., Katayama, Y., Asaoku, H., Kubo, T., Shimomse, S., Kimura, A. (2008). Osteoprogenitor differentiation is not affected by immunomodulatory thalidomide analogs but is promoted by low bortezomib concentration, while both agents suppress osteoclast differentiation. *International Journal of Oncology*, 33(1), 129–36.



- Murshed, M., Harmey, D., Millán, J. L., McKee, M. D., Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & Development*, 19(9), 1093–1104.
- Nakamura, I., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Suda, T. (2012). Regulation of osteoclast function. *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 22(2), 167–77.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17–29.
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wangner, E. F., Penninger, J. M., Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17(10), 1231–34.
- Neumann, E., Schett, G. (2007). Bone metabolism: molecular mechanisms. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 66(4), 286–89.
- Neve, A., Corrado, A., Cantatore, F. P. (2012). Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 204(3), 317–30.
- Ondrey, F. G., Dong, G., Sunwoo, J., Chen, Z., Wolf, J. S., Crowl-Bancroft, C. V., Mukaida, N., Van Waes, C. (1999). Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Molecular Carcinogenesis*, 26(2), 119–29.

- Oranger, A., Carbone, C., Izzo, M., Grano, M. (2013). Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., Owen, M. J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89(5), 765–71.
- Oyajobi, B. O., Garrett, I. R., Gupta, A., Flores, A., Esparza, J., Muñoz, S., Zhao, M., Mundy, G. R. (2007). Stimulation of new bone formation by the proteasome inhibitor, bortezomib: implications for myeloma bone disease. *British Journal of Haematology*, 139(3), 434–38.
- Ozaki, S., Tanaka, O., Fujii, S., Shigekiyo, Y., Miki, H., Choraku, M., Kagawa, K., Asano, J., Takeuchi, K., Kitazoe, K., Hashimoto, T., Abe, M., Matsumoto, T. (2007). Therapy with bortezomib plus dexamethasone induces osteoblast activation in responsive patients with multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, 86(2), 180–85.
- Pavkovic, M., Petrushevska, G., Jovanovic, R., Karanfilski, O., Cevreska, L., Stankovic, S., Stojanovic, A. (2010). Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates. *Prilozi / Makedonska Akademija Na Naukite I Umetnostite, Oddelenie Za Biološki I Medicinski Nauki = Contributions / Macedonian Academy of Sciences and Arts, Section of Biological and Medical Sciences*, 31(2), 39–49.
- Petrucci, M. T., Finsinger, P., Chisini, M., Gentilini, F. (2014). Subcutaneous bortezomib for multiple myeloma treatment: patients' benefits. *Patient Preference and Adherence*, 8, 939–46.

- Pham, L., Beyer, K., Jensen, E. D., Rodriguez, J. S., Davydova, J., Yamamoto, M., Petryk, A., Gopalakrishnan, R., Mansky, K. C. (2011). Bone morphogenetic protein 2 signaling in osteoclasts is negatively regulated by the BMP antagonist, twisted gastrulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(3), 793–803.
- Polzer, K., Neubert, K., Meister, S., Frey, B., Baum, W., Distler, J. H., Gückel, E., Schett, G., Voll, R. E., Zwerina, J. (2011). Proteasome inhibition aggravates tumor necrosis factor-mediated bone resorption in a mouse model of inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 63(3), 670–80.
- Preisinger, E. (2007). RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. *J Miner Stoffwechs*, 4, 144–45.
- Qiang, Y.-W., Heuck, C. J., Shaughnessy, J. D., Barlogie, B., Epstein, J. (2012). Proteasome inhibitors and bone disease. *Seminars in Hematology*, 49(3), 243–48.
- Qin, L., Qiu, P., Wang, L., Li, X., Swarthout, J. T., Soteropoulos, P., Tolias, P., Partridge, N. C. (2003). Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19723–31.
- Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R., Roman-Roman, S. (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of Bone and Mineral Research : the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(10), 1842–53.
- Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., Heinegård, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4473–75.
- Ribatti, D., Moschetta, M., Vacca, A. (2013). Macrophages in multiple myeloma. *Immunology Letters*, 161(2), 241-44.

- Rivollier, A., Mazzorana, M., Tebib, J., Piperno, M., Aitsiselmi, T., Rabourdin-Combe, C., Judric, P., Servet-Delprat, C. (2004). Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood*, 104(13), 4029–37.
- Roccaro, A. M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Dammacco, F., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2006). Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Research*, 66(1), 184–91.
- Rocheftort, G. Y. (2014). The osteocyte as a therapeutic target in the treatment of osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 6(3), 79–91.
- Rocheftort, G. Y., Pallu, S., Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International*: 21(9), 1457–69.
- Roodman, G. D. (1997). Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer*, 80(8 Suppl), 1557–63.
- Sapir-Koren, R., Livshits, G. (2014). Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporosis International*: 25(12), 2685-2700.
- Schumacher, M., Henß, A., Rohnke, M., Gelinsky, M. (2013a). A novel and easy-to-prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 9(7), 7536–44.
- Schumacher, M., Lode, A., Helth, A., Gelinsky, M. (2013b). A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Acta Biomaterialia*, 9(12), 9547–57.

- Seckinger, A., Meissner, T., Moreaux, J., Depeweg, D., Hillengass, J., Hose, K., Rème, T., Rösen-Wolff, A., Jauch, A., Schnettler, R., Ewerbeck, V., Goldschmidt, H., Klein, B., Hose, D. (2012). Clinical and prognostic role of annexin A2 in multiple myeloma. *Blood*, 120(5), 1087–94.
- Seckinger, A., Hose, D. (2014). Interaction between myeloma cells and bone tissue. *Der Radiologe*, 54(6), 545–50.
- Shin, D. H., Chun, Y.-S., Lee, D. S., Huang, L. E., Park, J.-W. (2008). Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, 111(6), 3131–36.
- Shipman, C. M., Croucher, P. I. (2003). Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Research*, 63(5), 912–16.
- Silvestris, F., Cafforio, P., Tucci, M., Grinello, D., Dammacco, F. (2003). Upregulation of osteoblast apoptosis by malignant plasma cells: a role in myeloma bone disease. *British Journal of Haematology*, 122(1), 39–52.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colomnero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), 309–19.
- Sondag, G. R., Salihoglu, S., Lababidi, S. L., Crowder, D. C., Moussa, F. M., Abdelmagid, S. M., Safadi, F. F. (2013). Osteoactivin Induces Transdifferentiation of C2C12 Myoblasts into Osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 229(7), 955–66.

- Sunwoo, J. B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crowl Bancroft, C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P., Van Waes, C. (2001). Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), 1419–28.
- Takazawa, Y., Tsuji, K., Nifuji, A., Kurosawa, H., Ito, Y., Noda, M. (2000). An osteogenesis-related transcription factor, core-binding factor A1, is constitutively expressed in the chondrocytic cell line TC6, and its expression is upregulated by bone morphogenetic protein-2. *The Journal of Endocrinology*, 165(3), 579–86.
- Terpos, E., Szydlo, R., Apperley, J. F., Hatjiharissi, E., Politou, M., Meletis, J., Viniou, N., Yataganas, X., Goldman, J. M., Rahemtulla, A. (2003). Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*, 102(3), 1064–69.
- Terpos, E., Heath, D. J., Rahemtulla, A., Zervas, K., Chantry, A., Anagnostopoulos, A., Pouli, A., Katodritou, E., Verrou, E., Vervessou, E.-C., Dimopoulos, M.-A., Croucher, P. I. (2006). Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand concentrations and normalises indices of bone remodelling in patients with relapsed multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 135(5), 688–92.
- Terpos, E., Sezer, O., Croucher, P. I., García-Sanz, R., Boccadoro, M., San Miguel, J., Ashcroft, J., Bladé, J., Cavo, M., Delforge, M., Dimopoulos, M. A., Facon, T., Macro, M., Waage, A., Sonneveld, P. (2009). The use of bisphosphonates in multiple myeloma: recommendations of an expert panel on behalf of the European Myeloma Network. *Annals of Oncology; Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20(8), 1303-17.



- Terpos, E., Christoulas, D., Kokkoris, P., Anargyrou, K., Gavriatopoulou, M., Migkou, M., Tsionos, K., Dimopoulos, M. A. (2010). Increased bone mineral density in a subset of patients with relapsed multiple myeloma who received the combination of bortezomib, dexamethasone and zoledronic acid. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21(7), 1561–62.
- Terpos, E., Christoulas, D. (2013). Effects of proteasome inhibitors on bone cancer. *BoneKEy Reports*, 2, 395.
- Terpos, E., Christoulas, D., Kastiris, E., Katodritou, E., Papatheodorou, A., Pouli, A., Kyrtsonis, M.-C., Michalis, E., Papanikolaou, X., Gkatzamanidou, M., Zervas, K., Dimopoulos, M. A. (2014a). The combination of lenalidomide and dexamethasone reduces bone resorption in responding patients with relapsed/refractory multiple myeloma but has no effect on bone formation: final results on 205 patients of the Greek myeloma study group. *American Journal of Hematology*, 89(1), 34–40.
- Terpos, E., Christoulas, D., Kastiris, E., Roussou, M., Migkou, M., Eleutherakis-Papaiakevou, E., Gavriatopoulou, M., Gkatzamanidou, M., Kanellias, N., Manios, E., Papadimitriou, C., Dimopoulos, M. A. (2014b). VTD consolidation, without bisphosphonates, reduces bone resorption and is associated with a very low incidence of skeletal-related events in myeloma patients post ASCT. *Leukemia*, 28(4), 928–34.
- Thirunavukkarasu, K., Halladay, D. L., Miles, R. R., Yang, X., Galvin, R. J., Chandrasekhar, S., Martin, T. J., Onyia, J. E. (2000). The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25163–72.

- Thormann, U., Ray, S., Sommer, U., Elkhassawna, T., Rehling, T., Hundgeburth, M., Henß, A., Rohnke, M., Janek, J., Lips, K. S., Heiss, C., Schlewitz, G., Szalay, G., Schumacher, M., Gelinsky, M., Schnettler, R., Alt, V. (2013). Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*, 34(34), 8589–98.
- Tinhofer, I., Biedermann, R., Krismer, M., Crazzolara, R., Greil, R. (2006). A role of TRAIL in killing osteoblasts by myeloma cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), 759–61.
- Tsai, M.-T., Lin, Y.-S., Chen, W.-C., Ho, C.-H., Huang, H.-L., Hsu, J.-T. (2011). Runx2 and Osterix Gene Expression in Human Bone Marrow Stromal Cells Are Mediated by Far-Infrared Radiation. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*. 2192(1), 2690-94.
- Uneda, S., Hata, H., Matsuno, F., Harada, N., Mitsuya, Y., Kawano, F., Mitsuya, H. (2003). Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM. *British Journal of Haematology*, 120(1), 53–55.
- Vallet, S., Mukherjee, S., Vaghela, N., Hideshima, T., Fulciniti, M., Pozzi, S., Santo, L., Cirstea, D., Patel, K., Sohani, A. R., Guimaraes, A., Xie, W., Chauhan, D., Schoonmaker, J. A., Attar, E., Churchill, M., Weller, E., Munshi, N., Jasbir, S. S., Weissleder, R., Anderson, K. C., Scadden, D. T., Raje, N. (2010). Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5124–29.
- Wang, L., Park, P., La Marca, F., Than, K., Rahman, S., Lin, C.-Y. (2013). Bone formation induced by BMP-2 in human osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*, 43(4), 1095–1102.

- Weitzmann, M. N., Roggia, C., Toraldo, G., Weitzmann, L., Pacifici, R. (2002). Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(11), 1643–50.
- White, D., Kassim, A., Bhaskar, B., Yi, J., Wamstad, K., Paton, V. E. (2013). Results from AMBER, a randomized phase 2 study of bevacizumab and bortezomib versus bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer*, 119(2), 339–347.
- Williams, S., Pettaway, C., Song, R., Papandreou, C., Logothetis, C., McConkey, D. J. (2003). Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(9), 835–43.
- Wong, P. K. K., Quinn, J. M. W., Sims, N. A., van Nieuwenhuijze, A., Campbell, I. K., Wicks, I. P. (2006). Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(1), 158–68.
- Wu, C.-J., Lu, H.-K. (2008). Smad signal pathway in BMP-2-induced osteogenesis- a mini review. *J Dent Sci*, 3(1).
- Xu, D.-R., Su, C., Zou, W.-Y., Xu, H.-R., Huang, S., Li, J., Luo, S.-K. (2010). Significance of sRANKL/OPG ratio in diagnosis of multiple myeloma bone disease. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi / Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui* = *Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, 18(2), 376–380.
- Ylä-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I., Hartikainen, J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(10), 1015–26.

- Zangari, M., Esseltine, D., Lee, C.-K., Barlogie, B., Elice, F., Burns, M. J., Kang, S.-H., Yaccoby, S., Najarian, K., Richardson, P., Sonneveld, P., Tricot, G. (2005). Response to bortezomib is associated to osteoblastic activation in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 131(1), 71–73.
- Zangari, M., Yaccoby, S., Pappas, L., Cavallo, F., Kumar, N. S., Ranganathan, S., Suva, L. J., Gruenwald, J. M., Kern, S., Zhan, F., Esseltine, D., Tricot, G. (2011). A prospective evaluation of the biochemical, metabolic, hormonal and structural bone changes associated with bortezomib response in multiple myeloma patients. *Haematologica*, 96(2), 333–36.
- Zangari, M. M., Terpos, E. E., Zhan, F. F., Tricot, G. G. (2012). Impact of bortezomib on bone health in myeloma: a review of current evidence. *Cancer Treatment Reviews*, 38(8), 968–80.

## 10 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler für die Überlassung des Dissertationsthemas, die fachliche Unterstützung und reibungslose Ermöglichung der Umsetzung. Ebenso möchte ich Ihm für die Ermöglichung der Nutzung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie danken.

Ich möchte ebenfalls Herrn Prof. Dr. Gabor Szalay danken, der mir als kritischer und konstruktiver Diskussionspartner eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit war.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Ulrich Thormann für die Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche.

Besonderen Dank an die Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie Frau Prof. Dr. Katrin Lips für die Nutzung der Einrichtung.

Herzlichen Dank auch an Frau Tanja Rehling für die Unterstützung bei der Durchführung der Färbungen. Ebenso danke ich Frau Dr. Seemun Ray und Herrn Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie für die immer tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für die Ermöglichung meines Werdeganges.

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum Unterschrift



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6387-0



9 783835 196387 0